Ueber die Beziehungen von Agaricineen und anderen humusbewohnenden Pilzen zur Mycorhizenbildung der Waldbäume

---

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

Philosophischen Fakultät II. Sektion
der kgl. bayr. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

JOSEF FUCHS

am 1. Juli 1910

STUTTGART 1910
E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Nägele & Dr. Sproesser

Ueber die Beziehungen von Agaricineen und anderen humusbewohnenden Pilzen zur Mycorhizenbildung der Waldbäume

---

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

Philosophischen Fakultät II. Sektion
der kgl. bayr. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

ACAD. LUGD BAT. BIBL.

vorgelegt von

JOSEF FUCHS

am 1. Juli 1910

STUTTGART 1910
E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Nägele & Dr. Sproesser

Genehmigt von der philosoph. Fakultät II. Sektion der Universität MÜNCHEN
auf Antrag des Herrn Geh. Hofrat Professor Dr. v. GOEBEL im Juli 1910

Diese Abhandlung erscheint mit 4 Tafeln in der **„Bibliotheca botanica"**
Herausgegeben von Geh.-Rat Prof. Dr. Chr. Luerssen, Heft 76

E. SCHWEIZERBART'sche VERLAGSBUCHHANDLUNG
Nägele & Dr. Sproesser, Stuttgart

Meinem Oheim

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Einleitung 1

A. Reinkultur der Abietineen 3

I. Herstellung und Sterilisation des Nährbodens 4
II. Sterilisation der Samen 5
III. Topfkulturen 5
IV. Keimung und Wachstum 6

B. Reinkultur der Pilze 6

I. Allgemeines 6
II. Kulturmethoden 7
1. Nährmedien überhaupt 7
2. Reaktion der Nährböden 8
3. Aussaat der Sporen und Sterilisierungsmethoden 8
4. Keimung und Wachstum; Impfungen 9
III. Einiges über die Biologie der kultivierten Pilze 11

C. Vereinigung von Pilz und Wurzel und deren Ergebnisse 16

I. Allgemeines 16
II. Die Synthese 18
III. Mycorhizenbildung an wenige Wochen alten, in unsterilisiertem Humus gewachsenen *Picea*-Pflänzchen 21
IV. Wiederholte Versuche, auf analytischem Wege einen Mycorhizenpilz zu bekommen 24
V. Letzte synthetische Versuche 25

D. Die wichtigsten Ergebnisse sämtlicher Untersuchungen 26

Wichtigste Literatur 29

Einleitung.

Das Zusammenleben von Wurzeln höherer Pflanzen mit Pilzen ist erst seit etwas über dreißig Jahren als Tatsache erkannt, nachdem man auf Grund einiger Erfahrungen und oberflächlicher Untersuchungen schon längst einen gewissen Zusammenhang zwischen Pilzen und Wurzeln mancher Phanerogamen vermutet hatte, so zwischen manchen Orchideen und Pilzen und zwischen Waldbäumen und Trüffeln im besonderen. 1856 hatte Gasparrini bei *Pinus Halepensis* die Würzelchen mit Pilzhyphen bedeckt gefunden und die letzteren Conferven genannt. Hartig[1]) hatte schon 1851 die ektotrophe Mycorhiza der Kiefer abgebildet und beschrieben, deren intercellulares Mycel jedoch als Intercellulargänge aufgefaßt. 1874 endlich kam Janczewski[2]) auf den Gedanken, daß die gabelförmigen Bildungen der Wurzeln von *Pinus Strobus* durch einen epiphytischen Pilz hervorgerufen werden; in demselben Jahre konstatierte Bruchmann bei *Pinus silvestris* einen von einem Pilz gebildeten „Mantel". 1880 stellte Reeß[3]) eine Verbindung von Elaphomycesmycel mit Kiefernwurzeln fest und glaubte davon und besonders von der Feststellung des Eindringens von Mycelfäden in das Innere der Wurzel auf die Mycorhizen bildende Natur von Elaphomyces schließen zu müssen.

1881 beobachtete Kamienski[4]) eine Verbindung eines Pilzes mit der Wurzel von *Monotropa hypopitys*, erkannte die epiphyte Natur des ersteren und maß ihm eine ernährungsphysiologische Bedeutung bei.

In eine neue Ära trat die Mycorhizenforschung, als Frank[5]) die Wurzeln einer größeren Anzahl von Waldbäumen untersuchte, zu dem überraschenden Ergebnis kam, daß eine ganze Reihe von Waldbäumen diese Pilzwurzel aufweist und das Zusammenleben als mutualistische Symbiose auffaßte. Von ihm stammt die Bezeichnung „Mycorhiza" für das symbiotische Gebilde.

Seitdem sind von Frank selbst und vielen anderen Forschern Studien über diese Erscheinung gemacht worden, man hat manche wertvollen Tatsachen festgestellt und vor allem die große Verbreitung der Pilzwurzel erkannt. Doch im Verständnis des Wesens derselben, ihrer Bedeutung in ernährungsphysiologischer Beziehung ist man über Theorien noch nicht hinausgekommen. Der Grund hiefür liegt wohl vor allem darin, daß man in solchen Fragen überhaupt noch wenig weiß. Wohl kennt man im allgemeinen die Nahrungsstoffe, die Pilz und Wurzel nötig haben, aber man weiß nicht viel davon, in welcher Form sie aufgenommen werden, man kennt die Zusammensetzung des Humus nicht, aus dem vorzugsweise beide Symbionten ihre Nahrung holen und kennt auch nur zum Teil die Art der Umsetzung von Nahrungsstoffen

[1]) Hartig: Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen Deutschlands. Berlin 1851.

[2]) Janczewski: Das Spitzenwachstum der Phanerogamenwurzeln. Bot. Zeitung 1874, Seite 113.

[3]) M. Reeß: Über den Parasitismus von Elaphomyces granulatus. Sitz.-Ber. der phys. med. Societät zu Erlangen. 1888, 8, S. 5.

M. Reeß und C. Fisch: „Untersuchungen über Bau und Lebensweise der Hirschtrüffel, Elaphomyces. Bibl. botanica 1887, Heft 7.

[4]) Kamienski: Die vegetativen Organe der Monotropa hypopitys. Bot. Zeitung 1881, Seite 457.

[5]) B. Frank: Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber. der Deutschen bot. Gesellschaft 1885, Bd. III, S. 128.

im Organismus. Die Versuche, die in bezug auf die viel diskutierte Stickstoffaufnahme der Pilzwurzel aus dem Humus gemacht wurden, haben zu keinem bestimmten Resultat geführt.[1]) Es wird Aufgabe der noch im Aufblühen begriffenen physiologischen Chemie sein, die Wege zur Lösung solcher Fragen zu ebnen. Mehr Erfolg ist gegenwärtig in der Beantwortung der Frage zu erwarten, welche Pilze mit der Wurzel zusammenleben, doch nicht auf dem Wege der Untersuchung schon vorhandener Mycorhizen, sondern auf dem Wege des synthetischen Experiments unter Ausschluß jeder weiteren Infektionsmöglichkeit.

Die Frage ist analytisch — Trennung des Pilzes von einer gegebenen Mycorhiza — wohl deshalb nicht leicht zu lösen, weil der Beweis nur schwer zu erbringen ist, daß der gezüchtete Pilz auch wirklich ein Mycorhizenpilz ist, außer es gelänge, mit diesem in Reinkultur gezogenen Pilz, zusammengebracht mit der Wurzel von einem steril gezogenen Pflänzchen, wieder eine Mycorhiza zu bekommen. Einen Mycorhizenpilz in Reinkultur zu bekommen ist aber schon deshalb nicht aussichtsreich, weil man die Wurzel nicht sterilisieren darf.

Möller[2]) hat aus Kiefernmycorhizen verschiedene Mucorarten kultiviert, diese dann mit, wie er annahm, unverpilzten Wurzeln zusammengebracht und daraus wieder dieselben Mucorarten herauskultiviert. Er ließ unsterilisierten Samen teils auf sterilisiertem, teils auf unsterilisiertem Sande keimen und brachte die Keimwurzel mit den Pilzen zusammen in der Art, daß die Wurzel durch zwei Töpfe hindurch in einen dritten zu wachsen hatte und beim jedesmaligen Durchwachsen des durchlochten Topfbodens mit dem Mycel in Berührung kam. Nach einigen Monaten entwickelte sich „aus den so gründlich als möglich gereinigten Wurzelprobestückchen, an denen von äußerlich anhaftenden Mycelien nichts zu entdecken war, jeweilig derjenige Mucor, mit dem das Würzelchen beim Durchstoßen des Topfbodens in Berührung gebracht worden war".

Abgesehen davon, daß die Pflänzchen der Synthese nicht steril gezogen worden waren, mußte hier von vorneherein mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß bei der Züchtung des Pilzes eine Pilzflora sich ansiedelt, die mit Mycorhizenbildung gar nichts zu tun hat, da ja die Pilzwurzel der Analyse nur abgewaschen werden darf. Von anatomischen Befunden, die sicheren Aufschluß gegeben hätten, erwähnt Möller nichts, glaubt im übrigen selbst nicht an die mycorhizenbildende Natur dieser Mucorineen, schon deshalb, weil diese unseptierte Hyphen haben, was bei den Pilzen der ektotrophen Mycorhiza noch nicht beobachtet worden ist.

Verfasser kann auf Grund seiner Versuche als feststehend angeben, daß ein Pilz unter Umständen, vielleicht angelockt durch Ausscheidungen der Wurzel, dieselbe vollständig umhüllt, ohne nur im mindesten eine Mycorhiza zu bilden.

Überraschende Ergebnisse brachte eine Arbeit von J. Peklo[3]). Darnach ist es Peklo gelungen, durch Trennung eines Pilzes von der Mycorhiza und nachfolgende Synthese mit einer Buchenwurzel Mycorhizen zu bekommen. Er stellte ein Decoct von Buchenmycorhizen her, wusch *Carpinus-* und *Fagus-*Wurzeln ab und zerschnitt sie mit sterilem Messer in Stücke. Letztere übertrug er auf das Decoct und bekam durch „Keimung" der Hyphen des Pilzmantels einige Waldpenicilliumarten. Die nachfolgende Synthese nahm er in der Weise vor, daß er die Sporen der reingezüchteten Pilze auf die Wurzeln von zweijährigen *Fagus*-Pflänzchen übertrug, nachdem er diese sorgfältig ausgewaschen und „mycorhizenfrei" befunden hatte. Bei der Untersuchung nach fünf Monaten erwiesen sich die Wurzeln als infiziert, „mit Mycorhizen besetzt". Peklo nimmt an, daß die aus den Sporen gewachsenen Mycelien nicht in dem sterilisierten Humus ihre Wachstumsbedingungen gefunden hätten, sondern in den Wurzeln, und hält den Beweis für erbracht, daß die Mycorhizen von *Fagus* in den Wäldern von Mittelböhmen von mehreren Waldpenicillien hervorgerufen werden.

---

[1]) Möller: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märk. Sandboden. Zeitschr. für Forst- und Landwirtschaft 1902/03.

[2]) Möller: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märk. Sandboden. Zeitschr. für Forst- und Landw. 1902/03, 1903, S. 321—338.

[3]) Peklo: Beiträge zur Lösung des Mycorhizenproblems. Ber. der Deutschen bot. Ges. 1908, Bd. 27, Seite 239.

Der Beweis ist jedoch nicht im mindesten erbracht, schon deshalb nicht, weil Peklo zur Synthese Buchenpflänzchen verwendete, die volle zwei Jahre in unsterilisiertem Humus gelebt hatten! Von der Abwesenheit der Gabelbildungen kann man unmöglich auf Mycorhizenfreiheit schließen.

Sicher sind es die verschiedensten Pilze, welche die Lebensgemeinschaft mit den Wurzeln der höheren Pflanzen eingehen. Das haben sowohl die anatomischen Befunde ergeben als auch die Tatsache, daß sich Mycorhizen in den verschiedensten Bodenarten gebildet haben, auch an ausländischen Pflanzen, die aus Samen auf inländischen Bodenarten gezogen worden waren. Bei der Untersuchung von Abiesmycorhizen hat Verfasser allein drei verschiedene Formen des Pilzmantels und der Hyphen festgestellt, die zweifellos auch von drei verschiedenen Pilzen herrührten.

Mehr Aussicht auf Erfolg als die Analyse von Pilzwurzeln bietet wohl der zweite Weg: eine bestimmte Pilzgruppe in Kultur zu nehmen und dann durch Synthese die Mycorhiza zu bekommen suchen. Es war naheliegend, daß man bei dieser Überlegung zuerst an die den Humus bewohnenden Pilze dachte, teils deshalb, weil die Mycorhiza im Humus am häufigsten auftritt, teils weil gewisse Humuspilze sehr häufig in der Nähe der Waldbäume zu finden sind. Einen Fingerzeig bot auch der Umstand, daß an den mit Mycorhizen in Verbindung stehenden Hyphen häufig Schnallen zu sehen sind, die ja ein Charakteristikum besonders der Hymenomyceten sind.

Der Gedanke, daß Hymenomyceten an der Mycorhizenbildung beteiligt sein könnten, hat schon früh zu Untersuchungen angeregt. Reeß[1]) fand bei seinen Untersuchungen über Elaphomyces, den er für einen Mycorhizenbildner hielt, Pilzscheiden, von denen er annahm, daß sie von Basidiomyceten — es sind wohl Hymenomyceten gemeint — gebildet wurden. Noack[2]) hat makroskopisch eine Verbindung von *Agaricus-*, *Cortinarius*, und *Lactarius*mycelien mit Wurzeln festgestellt und die Pilze für Mycorhizenbildner gehalten. Seine synthetischen Versuche mit *Geaster* scheiterten daran, daß die Sporen nicht keimten. Endlich stellte noch L. H. Pennington[3]) eine Verbindung von Mycelien mit Eichenwurzeln fest und glaubte daraus ebenfalls auf die mycorhizenbildende Natur von *Russula emetica*, *Boletus speciosus* Frost und *Tricholoma transmutans* schließen zu müssen.

Auch all diesen Untersuchungen kommt eine Beweiskraft nicht zu. Denn, wie erwähnt, kann ein Pilz eine Wurzel vollständig umhüllen, ohne nur im mindesten eine Mycorhiza zu bilden. Immerhin war die Wahrscheinlichkeit gegeben, daß die Hymenomyceten an der Mycorhizenbildung beteiligt sind. Um so viel wie möglich Klarheit in dieser Frage zu bekommen, wurde vorliegende Arbeit unternommen.

Bei der Frage nach den zu wählenden Wirtspflanzen dachte man an die Koniferen, speziell an die Abietineen; sind ja doch in unseren Nadelholzwäldern die Hymenomyceten am häufigsten.

A. Reinkultur von Abietineen.

Vor allem handelte es sich um die Frage, ob es überhaupt gelingen wird, Abietineen in Reinkultur zu ziehen. Versuche, von v. Tubeuf[4]), Nobbe[5]) und Möller[6]) haben das Gelingen außer Zweifel gestellt für die Kultur der gemeinen Kiefer, der Weymouthskiefer, der Fichte und der Lärche. Anders

[1]) Reeß: Über Elaptomyces und sonstige Wurzelpilze. Ber. der Deutschen bot. Ges. 1885.

[2]) Noack: Über Mycorhizen bildende Pilze. Bot. Zeitung 1889, Seite 389.

[3]) L. H. Pennington: Mycorhiza Producing Basidiomycetes. Rept. Michigan Akademie of Science X 1908.

[4]) v. Tubeuf: „Die Haarbildungen der Koniferen". Forstl. naturw. Zeitschrift 1896, Seite 184/185.
v. Tubeuf: „Beiträge zur Mycorhizafrage". Naturw. Zeitschr. für Land- und Forstwirtschaft 1903, S. 75.

[5]) Nobbe und Hiltner: Die endotrophe Mycorhiza von Podocarpus und ihre physiologische Bedeutung. „Die landwirtschaftl. Versuchsstationen" 1899, Bd. 51, Seite 241.

[6]) Möller: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märk. Sandboden. Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen 1903.

stand es um die Tanne. Theoretische Erwägungen sprachen nicht für ein Gelingen bei dieser. Während die Kiefern als anspruchslos in bezug auf Existenzbedingungen bekannt sind, stellt die Tanne ganz besondere Anforderungen in bezug auf Insolation, Feuchtigkeit und Ernährung. Auch einige interessante Ergebnisse der Stahlschen Untersuchungen sprachen dagegen. Stahl[1]) fand, daß die Pflanzen mit starker Wasserdurchströmung und Schnellwüchsigkeit der Mycorhizenbildung meist entbehren und führt dies auf die größere Fähigkeit bei diesen, Nährsalze aufzunehmen, zurück. Er teilte daraufhin die Mycorhizenpflanzen ein in fakultative und obligative. Da die Kiefer zur obigen Kategorie gehört, kann sie als fakultative Mycorhizenpflanze der Pilze entbehren. Anders bei der Tanne. Diese hat geringe Wasserdurchströmung und langsames Wachstum, gehört also zu jenen, die auf die Dauer der Pilze nicht entbehren können. Die bekannte Erscheinung, daß die mycorhizenfreien Gewächse sehr leicht, die Mycorhizenpflanzen jedoch oft schwer, mitunter überhaupt nicht kultiviert werden können, läßt sich aber auch auf andere Ursachen zurückführen, die mit der An- resp. Abwesenheit gewisser Pilze nur mittelbar im Zusammenhange stehen, in dem Sinne etwa, daß bestimmte Pilze den Humus in bestimmter Weise zersetzen, daß also die spezifischen Zersetzungsprodukte es sind, die die Pflanze braucht. Endlich kann es sich bei dem Pilzeinfluß auch nur um einen Reiz handeln. Das schlechte Wachstum der Mycorhizenpflanzen in steriler Kultur kann ebenso gut auf das Ausfallen dieses Reizes zurückgeführt werden. Sarauw hat beobachtet, daß das Wachstum nach der Infektion beschleunigt wird.

Nachdem von Goebel[2]) 1896 gezeigt hatte, daß durch Zusatz von Traubenzucker zum Nährsubstrat Sporen von *Funaria hygrometrica* in der Dunkelheit keimen und zu Protonemen von beträchtlicher Größe heranwachsen können, hat Bernard[3]) Samen von Orchideen, die ohne Pilzeinfluß als nicht keimfähig galten, mit Zucker behandelt und Keimung erzielt. Es kann also der Einfluß des Pilzes unter Umständen durch chemischen Einfluß ersetzt werden.

I. Herstellung und Sterilisation des Nährbodens.

Durch jahrelange Versuche von v. Tubeuf und Nobbe mit Kiefern, Fichten und Lärchen ist außer Zweifel gestellt, daß sich bei künstlichen Sandkulturen keine ektotrophen Mycorhizen bilden. Trotzdem wurde im Frühjahre 1908 eine Reihe von vollständig sterilen Kulturen in großen Kolben angelegt, um jede Möglichkeit einer nicht gewollten Mycorhiza auszuschließen. Es mußte ausprobiert werden, wie viel Sand und wie viel Nährlösung den für die Kultur geeignetsten Feuchtigkeitsgrad hervorrufen. Es wurde festgestellt, daß 250 ccm Nährlösung bei 750 ccm Sand das gewünschte Resultat ergeben. Da ein späteres Nachgießen von Nährlösung in die Kulturen wegen der Infektionsgefahr vermieden werden sollte, mußte die Nährlösung konzentrierter angewendet werden als Knop sie angibt: In 1 l destilliertes Wasser wurden deshalb

4 g $Ca(NO_3)_2$
1 g KH_2PO_4
1 g $MgSO_4$
1 g KCl

und drei Tropfen $FeCl_2$ gegeben. Je 750 ccm Sand wurden in ein Dutzend Kolben gegeben, diese mit Watte verschlossen und dann im Sterilisator zwei Stunden auf 150° erhitzt. Obwohl nun das Zugeben des Sandes zur Nährlösung umständlicher war als die Zugabe der letzteren zum Sande, wurde der erstere Weg gewählt,

[1]) Stahl: Sinn der Mycorhizenbildung. Jahrbücher für wiss. Botanik 1900.

[2]) v. Goebel: Über Jugendformen von Pflanzen und deren künstliche Wiederhervorrufuug. Sitzungsbericht der math. phys. Klasse der k. b. Akademie der Wissenschaften 1896.

[3]) N. Bernard: L'evolution dans la symbiose. Les Orchidees et leurs Champignons commensaux. Annales de sciences naturelles 1909. 9. Ser. Bot. IX, 1, Seite 1—64, 2/3 Seite 65—191.

da nur in diesem Falle der Sand sich mit Nährlösung vollsaugen konnte. Die Kolben wurden dann nochmal eine halbe Stunde im Dampftopf sterilisiert, nicht länger, da eine Zersetzung der Salze möglichst vermieden werden sollte.

II. Sterilisation der Samen.

Die ausgesuchten Samen von *Pinus Strobus, Pinus silvestris, Abies pectinata* und *Picea excelsa* wurden in Erlenmeyerkolben in 50prozentigem Alkohol geschüttelt, dieser weggegossen und konzentrierte H_2SO_4 hinzugefügt. Der Einwirkung der letzteren wurden die Samen fünf bis zehn Minuten überlassen. Sie nahmen dabei eine schwarze Färbung an. Dann wurde die Schwefelsäure weggegossen, die Samen mit sterilisiertem Wasser ausgewaschen und sterilisiertes $CaCO_3$ hinzugefügt, um der Neutralisierung aller noch vorhandenen Säure willen. Wie Hiltner und Kinzl in der naturwissenschaftlichen Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft 1906 angeben, eignet sich kohlensaurer Kalk und nicht Kalkmilch, da letztere im Überschuß schädlich wirkt. Der kohlensaure Kalk wurde mit sterilisiertem Wasser weggewaschen, darauf die Samen zum Teil einige Tage in wenig sterilisiertem Wasser der Quellung überlassen in denselben Erlenmeyerkölbchen, die zur Sterilisation gedient hatten. Mit sterilisierter Watte wurden sie verschlossen gehalten. Die Hälfte der Samen etwa wurde nach der Behandlung mit 50prozentigem Alkohol etwa fünf Minuten mit 1prozentiger Sublimatlösung behandelt, dann mit sterilisiertem Wasser ausgewaschen. Nach zwei Tagen der Quellung wurden die Samen mit sterilisierter Pinzette in strömendem Dampf in die einzelnen Kolben übertragen. Durch das Arbeiten im strömenden Dampf gelang es auch bei den späteren Arbeiten vorzüglich, die Invasion fremder Keime zu vermeiden. Um die Dämpfe möglichst zu verteilen, wurden über den Dampftopf stets engmaschige Drahtnetze gelegt.

Wenn nun auch die chemischen Bedingungen für das Wachstum der Pflänzchen in den Sandkulturen erfüllt waren, so waren doch die physikalischen Verhältnisse weniger günstig. Da der feine, mit Nährlösung getränkte Sand eine feste, kompakte Masse darstellte, war zu befürchten, daß die Wurzeln nur schwer würden in das Substrat eindringen können oder zum mindesten zu wenig Sauerstoff würden vorfinden. Die Untersuchungen Möllers über das Wachstum der Kiefern in verschiedenen natürlichen Bodenarten (Rohhumus, Humus, Bleisande und gelbem Sande) machen es sehr wahrscheinlich, daß zum großen Teil die mangelhafte Durchlüftung des natürlichen Sandbodens es ist, welche trotz des oft großen Reichtums desselben an Nährstoffen die Pflanze weniger gut gedeihen läßt als der Humus. Möller fand, daß das Wachstum im Rohhumus am besten war, geringer in dem darunter liegenden mullartigen Humus, noch schlechter im Bleisande und am allerschlechtesten im gelben Mineralsande, „obwohl wir von ihm wissen, daß er die an aufnehmbaren Nährstoffen reichste Bodenschicht darstellt".

Der feine Sand wurde deshalb mit grobem vermischt und nach Möglichkeit gelockert.

Ferner wurden Humus- und Torfmullkulturen, ebenfalls in Kolben, angelegt. Allerdings war hier zu befürchten, daß die Sterilisation das Substrat in einer Weise beeinflußte, daß wiederum kein günstiges Wachstum erzielt werden konnte. Frank ist es nicht gelungen, in sterilisiertem Humus gesunde Buchenpflänzchen zu bekommen. Vier Kolben wurden mit Torfmull und wenig Sand und zwei Kolben mit Humus und wenig Sand beschickt. Als Sterilisierungsmethode wurde fraktionierte Dampfsterilisation gewählt, da ein zu hohes Erhitzen und damit Zersetzung des Substrates vermieden werden sollte, soviel dies überhaupt möglich war.

III. Topfkulturen.

Neben den Kolbenkulturen wurden noch in Blumentöpfen Kulturen angelegt. Vier Blumentöpfe von 15—20 cm Durchmesser mit Untersätzen wurden mit Sand gefüllt, darüber Glasglocken gestülpt und zwar so, daß diese zwischen Topf und Untersatzrand zu sitzen kamen. Das Ganze wurde im Heißluft-

sterilisator mehrere Stunden auf 130° erhitzt. Im Dampftopf sterilisierte Nährlösung wurde sodann im strömenden Dampf über den Sand gegossen, wobei die Glocke nur wenig abgehoben wurde; darauf wurden die sterilisierten Samen ausgelegt und die Glocke wieder darüber gestülpt. Da hier mit stärkerer Verdunstung gerechnet werden mußte, wurde zwischen Glocke und Untersatzrand in Zeiträumen von einer bis zwei Wochen Knopsche Lösung oder sterilisiertes Wasser nachgegossen. Natürlich war die Knopsche Lösung vorher auch vorsichtig sterilisiert worden. Die Kolben- und Topfkulturen wurden im Glashause untergebracht, geschützt vor zu starker Insolation. Die Wattepfropfen der Kolbenkulturen wurden mit Seidenpapier umwickelt.

Eine sichere Gewähr dafür, daß sich nun kein Pilz entwickeln würde, war gleichwohl nicht gegeben, da nicht selten das Sameninnere durch Pilze zerstört ist, was von außen nicht immer konstatiert werden kann. Mit wenigen Ausnahmen blieben jedoch die Kulturen frei von solcher Infektion. Nur in einigen Fällen zeigte sich Pilzmycel an den Samen und machte deutlich den Eindruck, daß es aus dem Innern seinen Ursprung genommen hatte.

IV. Keimung und Wachstum.

Die Keimungsergebnisse waren schlecht bei *Pinus Strobus*. Während in der Regel eine Keimungsziffer von 60—70 Prozent angegeben wird, konnte in vorliegenden Versuchen nur eine etwa 10prozentige erzielt werden. Der Grund mußte, da die Samen als von letzter Ernte stammend angegeben worden waren, in der Sterilisation gesucht werden in dem Sinne, daß durch den Samenmund Sublimat eingedrungen war. Zwei Parallelkulturen mit unsterilisierten Samen brachten jedoch eine nur wenig höhere Keimungsziffer. Ähnlich verhielt es sich mit *Pinus silvestris*, sowohl im Frühjahre 1908 als im Winter 1909, als neue Kulturen angelegt worden waren. Da ferner die Keimungsziffer von *Picea excelsa* 70 Prozent betrug und *Abies pectinata* fast vollständig keimte, mußte die niedrige Keimungsziffer von *Pinus Strobus* und *Pinus silvestris* doch auf die mangelhafte Qualität der Samen zurückgeführt werden.

Wie nach den theoretischen Erwägungen anzunehmen war, sind die Pflänzchen von *Abies pectinata* nur kümmerlich ausgefallen. Sie wären wohl alle nach dem Verbrauch der Reservestoffe abgestorben. Die Beobachtungen erstreckten sich bei der Kultur auf sterilisiertem Sande auf eine Dauer von über zwei Monaten. Dann wurde etwa die Hälfte zum Zweck der Synthese in Humus versetzt und zeigte von da an zum Teil auffallend besseres Wachstum.

Im Laufe des Frühjahres 1909 wurden die Pflänzchen mit den Pilzmycelien auf Humus nebst Zusatz von Knopscher Lösung zusammengebracht. Als die *Abies*-Pflänzchen der Sandkultur anfangs Juli abstarben, legten einige der zur Synthese verwendeten die Primärblätter an. Ob dies auf bessere physikalische oder chemische Bedingungen zurückgeführt werden muß, läßt sich nicht sagen. Die Knopsche Lösung war hinzugefügt worden, weil der Verdacht bestand, daß der sterilisierte Humus keinen günstigen Nährboden für die Pflänzchen abgeben würde. Freilich konnte die Knopsche Lösung wiederum das Wachstum der Pilze hindern, worauf noch zurückzukommen sein wird.

B. Reinkultur der Pilze.

I. Allgemeines.

Von der ungeheuren Menge der Humus- und Mistbewohner konnte nur eine verschwindend kleine Anzahl herausgegriffen werden, selbst für den Fall, daß sich keine Kulturschwierigkeiten ergeben sollten; umfassen ja die Agaricineen allein zwanzig Gattungen und die Gattung *Agaricus* allein zweitausend Arten

(Brefeld). Verfasser ist der Meinung, daß darunter viele Pilze sind, die ein und derselben Art angehören, da, wie seine eigenen Kulturen bewiesen, die Variabilität der Fruchtkörper ein und derselben Art sehr groß sein kann. Die Agaricineen sind erst zu einem sehr kleinen Teil kultiviert worden, da die Sporen meist nicht keimten; zur Bestimmung dieser Pilzgruppe waren bis jetzt lediglich die Fruchtkörper maßgebend. Aber selbst, wenn sich die Zahl der Agaricineen noch als viel kleiner herausstellen wird, kann an eine eingehende Behandlung nicht gedacht werden, so lange es nicht gelingt, die Kulturschwierigkeiten zu überwinden.

Aus der Familie der Agaricineen wurden Vertreter von fünfzehn Gattungen: *Agaricus, Psalliota, Russula, Russulina, Lepiota, Coprinus, Amanita, Amanitopsis, Cortinarius, Paxillus, Lactarius, Cantharellus, Hypholoma, Collybia* und *Tricholoma* in Kultur genommen und zwar folgende Arten:

Agaricus helvolus Schaeff., *Agaricus amarus, Agaricus eburneus, Agaricus aggregatus, Agaricus albus* Schaeff., *Agaricus niveus, Psalliota silvatica, Psalliota campestris* var. *vaporaria, Psalliota campestris* var. *praticola, Russula virescens, Russula rubra, Russula lutea, Russulina alutacea, Lepiota procera, Coprinus papillatus, Coprinus nycthemerus, Coprinus micaceus, Amanita pustulata, Amanitopsis plumbea, Cortinarius armillatus, Paxillus involutus, Lactarius mitissimus, Lactarius rufus, Lactarius piperatus, Lactarius deliciosus, Cantharellus cibarius, Hypholoma lateritium, Collybia macrourus, Tricholoma bicolor.*

Aus der Familie der Hydneen: *Hydnum repandum, Hydnum imbricatum.*

Aus der Familie der Polyporeen: *Boletus edulis.*

Von den Ascomyceten aus der Familie der Discomyceten: *Morchella conica.*

Die dauernde Kultur gelang bei zehn Arten: *Agaricus albus* Schaeff., *Psalliota camp.* var. *vaporaria, Lactarius deliciosus, Hypholoma lateritium, Collybia macrourus, Tricholoma bicolor, Hydnum imbricatum, Coprinus papillatus, Coprinus nycthemerus, Coprinus micaceus.*

Von den übrigen waren die Sporen fast durchweg nicht gekeimt; nur bei einigen: *Lepiota procera, Psalliota silvatica, Amanitopsis plumbea* und *Russulina alutacea* konnte Keimung konstatiert werden, das Mycel starb jedoch bald ab. Bei *Russula virescens* wurde Mycelwachstum erzielt, doch konnte infolge des Mangels jeder Fruktifikation und infolge der Tatsache, daß bis jetzt noch bei keinem *Russula*pilz die Kultur gelungen ist (Brefeld), ein Identitätsnachweis nicht geführt werden.

II. Kulturmethoden.

1. Nährmedien überhaupt.

Zu den Kulturen wurden die verschiedensten Substrate verwendet, für die Humusbewohner Decocte von Pilzfruchtkörpern, Brot, Agar, Nährgelatine und Humus; für die Mistbewohner Mist, Nährgelatine und Erde, für den erdbewohnenden *Coprinus micaceus* Erde.

Als brauchbar für die Humusbewohner erwiesen sich Nährgelatine, Brot und Humus. Für die einleitenden Kulturversuche wurde meist Nährgelatine verwendet, teils weil auf ihr die meisten Keimungen erzielt wurden, teils weil die Keimung leichter festgestellt und das biologische Verhalten des Pilzes besser verfolgt werden konnte.

Die Nährgelatine wurde in der Zusammensetzung gewählt, wie sie im botanischen Institut der forstlichen Versuchsanstalt München zur Kultur von holzzersetzenden Pilzen mit Erfolg verwendet wird:

2,5 g Malzextrakt
2,5 g Fleischextrakt
10 g Gelatine und
100 g destilliertes Wasser.

Trotz ihrer Vorzüge war die Verwendung der Nährgelatine beschränkt; einerseits wurde sie durch fast alle Pilze verflüssigt, so daß das Mycel oft untersank und nur mehr spärlich weiterwuchs, anderseits bot sie kein geeignetes Substrat für die später vorzunehmenden Synthesen.

Brot erwies sich durchschnittlich als brauchbares Medium. Keimungen konnten in keinem Falle erzielt werden. Obwohl mit Humus mehr Erfolg zu verzeichnen war, wurden die Brotkulturen fortgesetzt, da sie geeignet waren, das allmähliche Anpassen der Mycelien an ein ihnen ungewohntes Substrat zu verfolgen. Nur ein einziger Pilz, *Collybia macrourus*, gedieh gleich anfangs gut. Die andern paßten sich nur allmählich an; *Tricholoma bicolor* gewöhnte sich erst nach monatelangen Kulturen an die ungewohnte Nahrung. Das verwendete Brot war, wie die Untersuchung zeigte, aus reinem Weizenmehl und Wasser (nicht Milch) hauptsächlich hergestellt. Die Pilze waren also beim Wachstum auf diesem Substrate zu einer übermäßigen Produktion von Diastasen gezwungen, an die sie wohl als Humusbewohner nicht gewöhnt sind.

Humus, das natürliche Substrat, lieferte nicht so gute Keimungsresultate wie die Nährgelatine, die Impfungen auf Humus hatten jedoch bei allen Humusbewohnern mit Ausnahme von *Hypholoma lateritium* guten Erfolg. Es ist letzteres wohl darauf zurückzuführen, daß dieser Pilz auf Baumstöcken vorkommt, also nicht als eigentlicher Humusbewohner zu betrachten ist. Kulturen auf faulem Holz hatten später auch den gewünschten Erfolg. *Hypholoma lateritium* wurde deshalb mit herangezogen, da junge *Picea*-Pflänzchen oft in großer Menge sich gerade auf faulenden Baumstümpfen ansiedeln; die Wurzeln dieser zeigen regelmäßig Mycorhizenbildung und sind mit dem faulen Holz völlig verwachsen.

Die Mistbewohner ließen sich nach leicht errungenen Erfolgen auf Mist auch auf Erde kultivieren, welcher ein wenig Mist beigefügt worden war; *Coprinus nycthemerus* ließ sich sogar auf Humus kultivieren. Das war von Wichtigkeit, da auch für die Mistbewohner ein Substrat gefunden werden mußte, das zugleich auch den Pflänzchen Gedeihen bot. Die Mistbewohner wurden deshalb in Kultur genommen, da nach den Befunden von v. Tubeuf gerade Mistbewohner besonders im Verdacht standen, Mycorhizenbildner zu sein.

Die Kultur des erdbewohnenden *Coprinus micaceus* gelang ohne Schwierigkeiten.

2. Reaktion der Nährböden.

Der Humus reagiert sauer. Da man also bei den Humusbewohnern eine Anpassung an saures Substrat anzunehmen hatte, wurde die zum Teil geringe Säure von Brot und Nährgelatine bei den Kulturen noch verstärkt durch Zusatz von einprozentiger Zitronensäurelösung. Dies geschah obendrein zu dem Zweck, die Spaltpilze abzuhalten. Trotz peinlichster Vorkehrungen ist es ja oft nicht möglich, die Bakterien ohne Säure abzuhalten.

Angeregt durch die Beobachtungen Brefelds[1]), daß es bei den Basidiomyceten häufig gerade die Säure sei, welche, auch wenn sie spurenhaft vorherrscht, die Entwicklung hindert, sogar nicht einmal die Keimung der Sporen gestattet, ferner durch die eigene, daß einige Pilze auf einem Substrat ohne Säurezusatz besser wuchsen als auf dem angesäuerten, und daß einige Mycelien kurz nach der Keimung abstarben, machte Verfasser Versuche mit Nährgelatine, welcher teils $KHCO_3$, teils $(NH_4)_3 PO_4$ bis nahezu zur Neutralisation hinzugefügt worden war.

Die Versuche haben ein negatives Resultat ergeben. *Hydnum imbricatum*, welcher auf angesäuertem Substrat am schlechtesten gewachsen war, wuchs auf der fast neutralen Nährgelatine durchaus nicht besser, das Wachstum blieb sogar hinter dem anderen etwas zurück. Auch die übrigen Pilze zeigten geringeres Wachstum.

3. Aussaat der Sporen und Sterilisierungsmethoden.

Die Pilze wurden, soweit sie Humuspilze waren, in den Wäldern gesammelt, womöglich jede Art in zwei oder mehreren Exemplaren; je ein Exemplar wurde in Seidenpapier gewickelt und darin belassen bis zur Gewinnung der Sporen; die anderen dienten zur Bestimmung der Art.

---

[1]) Brefeld: Mycologische Untersuchungen, Heft IV, Seite 7.

Durch Herrn Prof. v. Tubeuf wurde Verfasser auf eine Methode der Sporengewinnung aufmerksam gemacht, durch welche es ihm ausnahmslos gelang, fremde Keime abzuhalten. Von den mehrere Hundert zählenden Kulturen waren nur zwei durch fremde Pilze verunreinigt worden; die Verunreinigung war in diesen Fällen dadurch verursacht worden, daß das hymeniale Gewebe selbst schon allen möglichen Verunreinigungen ausgesetzt gewesen war. Es wurden stets solche Fruchtkörper bevorzugt, bei denen das Velum noch nicht zerrissen war.

Die Methode der Sporengewinnung bestand in der Verwendung von zwei Zinnkapseln, wie sie zum Verschluß von Weinflaschen Verwendung finden. Die eine wird siebartig durchlöchert, die andere darüber gestülpt. War das Substrat im Erlenmeyerkölbchen untergebracht, dann wurde zuerst die durchlöcherte, dann die undurchlöcherte Kapsel, in deren Boden angefeuchtete Watte gesteckt worden war, darüber gestülpt, dann das Ganze im Autoclaven sterilisiert, wenn es sich um Brot oder Humus als Nährmedium handelte. Wurde Nährgelatine verwendet, dann mußte, da diese im Autoclaven die Gerinnungsfähigkeit verliert, fraktionierte Sterilisation im Dampftopf angewendet werden. Die angefeuchtete Watte hatte den Zweck, einen Turgor der Zellen des verwendeten *Hymeniums* und damit ein Ausgeschleudertwerden der Sporen zu bewirken. War die Sterilisation vollzogen, dann wurde das Kölbchen in strömenden Dampf gestellt, mit sterilisiertem Skalpell ein Stück aus dem hymenialen Teile herausgeschnitten, dieses auf die durchlöcherte Kapsel gelegt und darüber die undurchlöcherte gestülpt. Nach drei bis vier Stunden, spätestens nach einem halben Tage, wurden die Kapseln weggenommen und der Kolben mit sterilisierter Watte verschlossen.

Eine andere Methode gelang dadurch, daß in eine sterilisierte Petrischale mit sterilisierter Nährgelatine ein ausgeglühtes und mit absolutem Alkohol abgekühltes Drahtnetz, mit dem hymenialen Gewebe obenauf, gelegt wurde. Ging die Keimung vor sich, dann wurde das Mycel auf Brot oder Humus übergeimpft, wenn nicht, eine Anzahl der Sporen samt der Nährgelatine. Damit die Sporen in diesem Falle in Berührung mit dem neuen Substrat kamen, wurde dieses von außen her durch heißes Wasser bis zum Schmelzen der Gelatine erwärmt.

4. Keimung und Wachstum; Impfungen.

Wie schon erwähnt, erfolgte Keimung nur bei einem Teile der Pilze. Unter diesen waren wiederum einige, deren Mycel bald nach der Keimung abstarb. Es ist möglich, daß die Säure daran schuld war, wahrscheinlich ist es nach den Ergebnissen nicht.

Bei den übrigen wurde die Keimung auch nicht ohne weiteres erzielt. Die gewöhnliche Gelatinekultur war bei *Agaricus albus* resultatlos geblieben. Angeregt durch die Versuche von v. Tubeuf, Hartig und Möller in bezug auf die stimulierende Wirkung der phosphorsauren Salze, brachte Verfasser die Sporen auf Nährgelatine, welche mit einer einprozentigen Lösung von $(NH_4)_3 PO_4$ bereitet worden war. v. Tubeuf hat zuerst darauf hingewiesen, daß sich die drei Salze der Phosphorsäure verschieden verhalten je nach der Reaktion, daß nur $NH_4 H_2 PO_4$ das Mycelwachstum — es handelte sich um den Hausschwamm — fördert, daß dagegen die beiden andern Salze schädlich wirken, sobald dadurch das Substrat seine sauren Eigenschaften verliert.

1908 hat Miß Rumbold[1]) in einer Arbeit über einige holzzersetzende Pilze diese Tatsache auch bei diesen festgestellt. Um jedoch auch die Brefeldsche Beobachtung von der Schädlichkeit der Säure in Betracht zu ziehen, wurde zuerst das alkalische tertiäre Salz verwendet und die Säure des Substrats damit fast bis zur neutralen Reaktion abgestumpft. Es trat wohl Keimung ein, das Wachstum des Mycels war jedoch sehr gering. Die Impfungen auf ein Substrat, dessen Säure infolge Verwendung von $NH_4 H_2 PO_4$ nicht abgestumpft war, hatten bedeutend besseres Wachstum zur Folge. Die Keimung konnte auf Nähr-

[1]) Rumbold: Beiträge zur Kenntnis der Biologie holzzerstörender Pilze. Naturw. Zeitschr. für Land- und Forstwirtsch. 1908, 2. Heft.

gelatine leicht festgestellt werden. Dadurch, daß die Sporen nur durch die Löcher der Kapsel fassen konnten, ergaben sich bei der Keimung auf der Nährgelatine matte Punkte fast in derselben Verteilung, wie die Löcher der Kapsel. Bei allen anderen Kulturen mit Ausnahme der erwähnten zwei blieb die Nährgelatine völlig klar.

Im Sommer 1908 waren die Sporen, welche keine Keimung ergeben hatten, in sterilisierten Petrischalen, in welche sie mittels der zweiten Methode gebracht worden waren, aufbewahrt worden. Im Herbste desselben Jahres wurden nochmals Keimungsversuche angestellt, teils durch Anwendung von Kälte mit darauffolgender Wärme, teils von $NH_4 NO_3$ und $NH_4 H_2 PO_4$. Die Versuche verliefen sämtlich resultatlos. Auch die Gelatinekulturen mit den ungekeimten Sporen wurden der Kälte (im Freien) und darauffolgender Wärme ausgesetzt (-2^0, -4^0, -1^0, 0^0, $+2^0$, $+15^0$). Die Kulturen wurden täglich untersucht. Am zwölften Tage war Tauwetter eingetreten; bei der Untersuchung zeigte die Kultur von *Amanitopsis plumbea* deutlich das Löcherbild; die mikroskopische Untersuchung ergab Keimung. Weiteres Wachstum erfolgte jedoch nicht, obwohl die Kultur darauf in den Arbeitsraum mit einer Temperatur von $+15^0$ Reaumur gebracht worden war.

Die Annahme Brefelds, daß die Keimung vieler Sporen der Hymenomyceten an eine Ruheperiode gebunden sei, war die Veranlassung, daß die Sporen in den Gelatinekulturen, die ja Feuchtigkeit enthielten, aufbewahrt wurden. Im Frühjahr 1909 wurde der inzwischen ausgetrockneten Gelatine sterilisiertes Wasser zugesetzt und die Temperatur auf 25° Celsius gebracht. Keimung erfolgte nicht.

Mit großer Leichtigkeit keimten die Sporen der *Coprinus*-Arten. Bei allen drei erfolgte Keimung schon nach wenigen Tagen. Die Sporen von *Coprinus papillatus* wurden im Sommer 1908 gewonnen, die von *Coprinus nycthemerus* und *Coprinus micaceus* im Herbst. Auch monatelanges trockenes Aufbewahren scheint manchen *Coprinus*-Arten nicht zu schaden. Die am 1. Juli gesammelten Sporen von *Coprinus papillatus* wurden am 27. November nochmals auf Mist ausgelegt; am 10. Dezember konnte Keimung und weiterhin reichliche Mycelentwicklung festgestellt werden. Die Keimfähigkeit war also wohl etwas herabgesetzt, doch nicht vernichtet worden.

Bei den Sporen von *Psalliota campestris* var. *praticola* hatten die eingehendsten Keimungsversuche keinen Erfolg. Die frischen Sporen waren im Sommer auf Nährgelatine ohne und mit $(NH_4) H_2 PO_4$ ausgelegt und im Herbste dem Kälte- und Wärmereiz ausgesetzt worden, nachdem sie auf feuchtem, sterilem Sande aufbewahrt worden waren. Die günstigen Erfolge der Miß M. Ferguson[1]) in dieser Beziehung, deren Versuche zum großen Teil, alle ohne Erfolg, wiederholt wurden, sind nicht zu verstehen, wenn man nicht biologische Ursachen des Nichtkeimens annimmt, etwa mangelnde Reife oder mangelnde Entwicklungsfähigkeit mancher Varietätssporen überhaupt.

In ihrer Arbeit erwähnt Miß Ferguson auch, daß das wachsende Mycel die Keimung der Sporen in irgendeiner Weise günstig beeinflusse. Duggar[2]) stellte darüber ebenfalls Untersuchungen an und bestätigte in seiner Arbeit über Pilzezucht die Richtigkeit der Beobachtung. In derselben Arbeit berichtet er über seine neue Methode, Pilze zu züchten. Veranlaßt durch die Beobachtung, daß Verletzungen an jungen Pilzen dadurch geheilt werden, daß Hyphen vom Rande über die verletzten Stellen wachsen, kamen er und M. Ferguson auf den Gedanken, Kulturen herzustellen dadurch, daß sie Gewebestückchen aus dem Fruchtkörper des Pilzes auf das Substrat übertrugen — „the tissue-culture method". Mißerfolge waren bei dieser Methode, wie Duggar versichert, nicht zu verzeichnen, außer „wenn der Pilz zu alt war, wenn Bakterien die Kultur befielen oder wenn ein ungünstiges Medium gewählt worden war".

Er konstatierte ferner, daß auch das durch Gewebeimpfung gewonnene neue Mycel die Sporenkeimung anregt und hat Keimung nach seinen Angaben auf diese Weise innerhalb drei bis fünf Tagen bei *Psalliota campestris* erzielt. Verfasser versuchte nunmehr, durch Gewebeimpfung Mycelwachstum zu bekommen und durch Einwirkung des letzteren auf die Sporen auch Keimung der letzteren. Die Gewebe-

[1]) M. Ferguson: „A preliminary study of the germination of the spores of Agaricus campestris and other Basidiomycetes Fungi. U. S. Depart. of Agric. 1902.

[2]) Duggar: The principles of mushroom growing and mushr. spawn making. Bureau Plant. Ind. U. S. Dept. Agric. 1905, Bull. 85, page 1—60.

impfung gelang; die Sporen keimten jedoch trotz wiederholter Versuche nicht. Die Gewebeimpfung wurde in der Weise vorgenommen, daß mit sterilisiertem Skalpell aus dem Innern des Fruchtstieles ein Stückchen herausgenommen und direkt auf das Substrat übertragen wurde, teils auf Nährgelatine, teils auf alten Mist. Es handelte sich um die Varietät *Psalliota campestris vaporaria.*

Die Gewebestückchen wurden am 16. Dezember 1908 ausgelegt; schon am 22. Dezember zeigte sich in der Gelatinekultur Wachstum, das in den nächsten Tagen fortschritt, doch nicht auf das Substrat übergriff. In der Mistkultur zeigte sich kein Wachstum. Am 24. Dezember wurde das Gewebestückchen aus der Gelatinekultur herausgenommen und auf Erde, welcher etwas alter Mist zugefügt worden, übertragen. Am zweiten Januar war ein Übergreifen des Mycels auf das Substrat zu beobachten. Das Wachstum schritt langsam fort und wurde erst besser, als das Mycel auf noch älteren Mist übertragen worden war.

Gewebekulturen, die mit *Boletus edulis* und *Russulina alutacea* vorgenommen worden waren, hatten keinen Erfolg gehabt.

III. Einiges über die Biologie der kultivierten Pilze.

Agaricus albus Schaeff.

Gefunden im Walde zwischen Gräfelfing und Planegg (bei München). Bestimmt nach Schaeffer: Fungorum icones 1762, Tafel 256.

Ag. albus Schaeff. wurde bis jetzt noch nicht kultiviert, soweit dem Verfasser bekannt.

Die Sporen keimten, wie schon erwähnt, erst nach Behandlung mit $(NH_4)_3 PO_4$ und zwar nach vierzehn Tagen. Von allen kultivierten Humusbewohnern war bei diesem das Mycelwachstum am geringsten. Das Mycel ist, makroskopisch betrachtet, von schmutzig weißer Farbe, hyalin und außerordentlich zart; die Dicke schwankt zwischen 1,1 und 2,3 μ. Die Septierungen sind schwer zu erkennen und nicht häufig; mit Sicherheit konnten sie erst bei inhaltslosen Hyphen festgestellt werden. Das Wachstum war besser ohne Zusatz von Zitronensäure; pathologische Veränderungen waren jedoch bei den Mycelien der angesäuerten Kulturen nicht vorhanden, es müßten denn keulenförmige Anschwellungen an vielen Septierungen als solche aufzufassen sein. Auffallend sind höckerartige Gebilde, die in allen Kulturen, immer in der Nähe der Septierungen, auftraten; sie machten infolge dessen den Eindruck von Schnallen, die im ersten Stadium der Entwicklung stehen geblieben waren. Wenn die Hyphen anfangen, zu hungern, zeigen sie Neigung, sich zu Strängen aneinander zu legen. In einigen Kulturen konnte Ausscheidung weniger undeutlicher Kristalle konstatiert werden. Um ihre Natur festzustellen, wurde HCl zugegeben, wodurch sie ohne CO_2-Entwicklung gelöst wurden; da sie sich in $CH_3 COOH$ und KOH nicht lösten und Zusatz von H_2SO_4 und Erwärmen Gipsnadeln zur Folge hatte, war die gewöhnliche Ausscheidung von $Ca(COO)_2$ nicht mehr zweifelhaft.

Bildung von typischen Schnallen erfolgte kein einziges Mal; ebenso fehlte Oidienbildung und sonstige Nebenfruktifikation. Vakuolenbildung war in den Brotkulturen häufiger als in den anderen.

Psalliota campestris var. *vaporaria.*

Bezogen von einem Gärtner im Winter. Bestimmt nach Rabenhorst I, Seite 658.

Psalliota campestris wurde von M. Ferguson und Duggar kultiviert.

Die Kultur gelang durch Gewebeimpfung, wie schon erwähnt. Der Inhalt des Mycels ist hyalin oder körnig, die Dicke schwankt zwischen 2 und 2,5 μ. Die Septierungen sind zahlreich. Häufig werden Anastomosen gebildet. Schnallenbildung und Nebenfruktifikation fehlten. Nicht selten sind Anschwellungen an den Septierungen zu beobachten.

Auch auf Humus wuchs schließlich das Mycel, wenn auch spärlich. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß das ungewohnte Substrat krankhafte Veränderungen hervorgerufen hatte. Die An-

schwellungen waren stärker geworden, die Vakuolen häufiger; das Mycel sah buckelig und gedrungen aus. Die Vakuolen zeigten gelbliche, das Licht stark brechende Einschlüsse als Reste des Zellsaftes.

Die Hyphen zeigten das Bestreben, sich aneinander zu legen und zwar so sehr, daß dadurch makroskopisch deutlich sichtbare Stränge entstanden.

Lactarius deliciosus.

Gefunden im Walde bei Planegg (bei München). Bestimmt nach Michael: Führer für Pilzfreunde I, No. 37; Rabenhorst: 1884, S. 548.

Die Gattung *Lactarius* ist von Hoffmann, de Bary und Weiß studiert worden, doch nur die Morphologie, da die Sporen nicht keimten; cf. auch Brefeld, Mycologische Untersuchungen, VIII, Seite 35. In seinen „Neuen Untersuchungen" 1908 wiederholt Brefeld seine schon früher gewonnene Erfahrung, daß es besonders die den Boden bewohnenden Pilze seien, welche die Keimung versagen, ohne die Gattung *Lactarius* besonders zu erwähnen.

Die Sporen keimten auf saurer Nährgelatine nach zirka acht Tagen in einer von zwei Kulturen; die andere Kultur war nicht angesäuert worden. Auf Humus erfolgte keine Keimung. Das Mycel wuchs rasch und üppig. Es ist ungemein zart; die Dicke schwankt zwischen 1 und 2,5 μ; die Hyphen sind hyalin, manchmal mit Vakuolen. Die Septierungen werden deutlich erst bei Hyphen ohne Inhalt. Es werden reichlich Lufthyphen gebildet von blendend weißer Farbe sowohl auf Humus wie auf Brot.

Auffallend war die ungeheure Oidienbildung, sowohl bei Brot- wie bei Humuskulturen. Da neu angelegte Kulturen keine Oidienbildung zeigten, ist anzunehmen, daß diese nicht durch Mängel des Substrates, sondern durch den Verbrauch der Nahrungsstoffe veranlaßt worden war.

Kristalle von oxalsaurem Kalk wurden reichlich ausgeschieden. In den Brotkulturen schied der Pilz stets eine klare bernsteingelbe Flüssigkeit in Tropfenform ab. Die Untersuchung mit Lackmus und Phenolphthaleïn ergab saure Reaktion; der Farbstoff ist nicht lipochromartiger Natur. Schnallenbildung fehlte.

Hypholoma lateritium.

(Synonym: *Agaricus lateritius* Schaeff.)

Gefunden in den Wäldern der Moorkulturanstalt Bernau, bestimmt nach Michael II, No. 66; Rabenhorst 1884, S. 652.

Hypholoma lateritium ist noch nicht kultiviert worden; Brefeld hat drei Arten der Gattung in Kultur genommen: *H. fasciculare*, *H. sublateritium* und *H. pyrotrichum*; der letztere ergab keine Sporenkeimung.

H. appendiculatum wurde von M. Ferguson kultiviert.

Die Sporen keimten auf saurer Nährgelatine nach etwa vierzehn Tagen. Das Mycel wuchs reichlich in einzelnen Polstern, zwischen denen die Hyphen in die flüssig gewordene Nährgelatine untersanken. Es schmiegt sich eng an das Substrat an, bildet wenig Luftmycel und hat das Aussehen feinen Zuckerstaubes.

Die Septierungen sind stets deutlich zu erkennen; der Inhalt ist teils hyalines, teils körniges Plasma, dem oft Öltröpfchen eingelagert sind, die die Osmiumreaktion deutlich ergaben. Die Hyphen bilden häufig Anastomosen; ihre Dicke schwankt zwischen 1 und 4 μ. Schnallen wurden in großen Mengen gebildet (Tafel I Fig. 1 u. 2). Merkwürdigerweise zeigte sich in einer späteren Gelatinekultur trotz mehrfacher eingehender Untersuchungen keine Spur von Schnallen, wohl ein Beweis dafür, daß die Schnallenbildung, beziehungsweise das Fehlen derselben nicht als ein stehendes Charakteristikum eines Pilzes angesehen werden kann. Schon wenige Tage nach der Keimung tritt Oidienbildung auf, die allmählich ganze Mycelfäden ergreift.

Kristalle von oxalsaurem Kalk wurden in Menge ausgeschieden. Auf Brot wuchs der Pilz anfangs schlecht. Auch hier bildete er Polster, zwischen denen makroskopisch kein Mycel zu sehen war. Die allmähliche Anpassung an die ungewohnte Nahrung konnte bei diesem Pilz besonders gut beobachtet werden.

Die Untersuchung der ersten Kulturen ergab durchweg mehr oder minder ausgeprägte pathologische Veränderungen, die in eigentümlichen, buckeligen und kugelförmigen Anschwellungen bestanden (Tafel I Fig. 3—8). Der Inhalt der Hyphen war teils hyalin, teils körnig. Manchmal hörte das Plasma mitten in einer Hyphe an einer Septe auf. Der Pilz wuchs auf Brot mit Säurezusatz etwas besser als auf ungesäuertem. Das mag teils darauf zurückzuführen sein, daß auf dem letzteren Bakterien das Wachstum hemmten, teils darauf, daß der Pilz an sauren Zellsaft gewöhnt ist. Das letztere läßt sein Vorkommen an noch ziemlich frischen Baumstümpfen vermuten. Eine Brotkultur zweieinhalb Monate später zeigte zum erstenmale normales Mycel wie die Gelatine- und Humuskulturen. Kristallausscheidung und Oidienbildung war auf Brot geringer wie auf Nährgelatine.

Auf reinem Humus erfolgte nur geringes Wachstum, sehr gutes auf mit faulendem Holz gemischtem Humus. Auf diesem Substrat war Oidienbildung und Kristallausscheidung an manchen Stellen ungeheuer. Frisch wachsendes Mycel bildet, wie wiederholte Untersuchungen ergaben, keine Oidien; sie treten erst nach einigen Tagen auf. Sie zeigen nicht die rundliche kurze Form der Oidien von *Hypholoma fasciculare*, wie sie Brefeld in seinen Mycolog. Untersuchungen, Heft VIII, Tafel IV, abbildet. Sie sind meist stäbchenförmig, von verschiedener Länge, selten isodiametrisch gestaltet. Einrollung der Enden von Oidienschnüren, wie sie Brefeld bei *Hypholoma fasciculare* beobachtete, kommt auch bei *Hypholoma lateritium* vor (Tafel I Fig. 9 u. 10). Nach Schnallen suchte Verfasser bei älteren Kulturen stets vergeblich.

Collybia macrourus.

(Synonym: *Agaricus macrourus* var. 1 Scop.)

Gefunden im Walde bei Schloß Seefeld (bei München). Bestimmt nach Michael II, No. 83; Rabenhorst 1884, S. 783.

Brefeld hat acht Arten der Gattung *Collybia* in Kultur genommen, *Collybia macrourus* nicht. Die Sporen von *Collybia fusipes* keimten nicht. Mycolog. Untersuchungen, Heft VIII, Seite 56 ff.

Die Sporen wurden auf Nährgelatine ausgelegt und keimten nach einigen Tagen. Durch das Mycelwachstum wird die Gelatine stark verflüssigt. Der Pilz bildet reichliches Luftmycel von flaumigem Aussehen und blendend weißer Farbe. Der Inhalt ist homogen und hyalin, die Septierungen sind nicht zahlreich, vielfach mit Schnallenfusionen. Die Dicke der Fäden schwankt zwischen 1 und 3 μ, erreicht manchmal auch 4,5 μ. Beim Wachstum auf Brot zeigten sich anfangs deutlich pathologische Bildungen: blasenartige Erweiterungen, der Inhalt mit einer Unzahl von Vakuolen durchsetzt. Von allen Humusbewohnern gelang es nur bei *Tricholoma bicolor* und bei diesem, Fruchtbildung herbeizuführen. Das häufige Überimpfen des Mycels von einem Substrat auf das andere hatte nebenbei den Zweck gehabt, den Pilz zur Fruktifikation anzuregen. Da die Pilze zur letzteren häufig dann schreiten, wenn die Existenzbedingungen anfangen, schlechte zu werden, war zu vermuten, daß beim Überimpfen des Mycels von einem günstigen Nährboden auf einen ungünstigen der Zweck einigermaßen erreicht würde. Es wurden zwei Fruchtkörper erzielt, beide auf Brotkulturen vom 29. Jan. 1909 mit Mycel aus Gelatinekulturen vom 19. Nov. 1908. Der eine Fruchtkörper erschien am 21. April, der andere am 5. Mai. Beide waren viel kleiner als die aus dem Walde geholten, doch an Farbe und Form sofort zu erkennen (Tafel I Fig. 11 [Phot. des einen der beiden Fruchtkörper]). Oidienbildung wie sie Brefeld bei einigen Arten beschreibt, ebenso Sclerotienbildung, wie er sie bei zwei Arten festgestellt hat, fehlten. Wurden die Kulturen alt, dann sank das Mycel zusammen und bildete eine glatte, lederartige Oberfläche mit gebräunten Stellen, die bei mikroskopischer Untersuchung sich als gewebeartig verbundene Hyphenmassen erwiesen, an der Peripherie stark gebräunt, gegen das Innere immer weniger (Tafel I Fig. 12).

Es handelte sich dabei um das Eingehen eines Dauerzustandes, ähnlich wie ihn Harder in seiner Arbeit über *Xylaria hypoxylon* in der Naturw. Zeitschrift für Forst- und Landwirtschaft 1909 Seite 451 als Zonenbildung beschreibt. Harder nennt mit Recht die Zonenbildung ein Schutzmittel des Pilzes gegen ungünstige Verhältnisse; daß aber die Farbstoffausscheidung nur eine nebensächliche Erscheinung ist, wie er meint, kann schon deshalb nicht zugegeben werden, weil überall da, wo es sich um derartige Schutz- und Dauer-

bildungen handelt, Farbstoffe und zwar braune, in den Membranen abgelagert werden, so beim Kernholz, bei der Korkbildung, bei der Rinde der Sklerotien und Rhizomorphen usw. Auch wäre dann gar nicht einzusehen, warum die Farbstoffbildung immer gerade in der äußeren Schicht erfolgt.

Die Schnallenbildung trat bei *Collybia* am häufigsten auf; in einem Falle war eine Schnalle zu einer neuen Hyphe, wiederum mit einer Schnalle, ausgewachsen. Kristallausscheidung fehlte.

Tricholoma bicolor.

(Synonym: *Agaricus bicolor* Persoon; *Agaricus personatus* Fries.)

Gefunden in den Wäldern bei Matrei a. Brenner und bei Planegg (bei München).

Bestimmt nach Michael II, No. 89; Rabenhorst 1884, Seite 810.

Brefeld hat von der Untergattung *Tricholoma* sechs Arten in Kultur genommen, von denen nur die Sporen von einer Art, *Tricholoma sordidum*, keimten. Mycologische Untersuchungen, Heft VIII, Seite 54.

Die Sporen keimten auf Humus und Nährgelatine nach etwa acht Tagen. Die Gelatine wurde durch das Wachstum sehr stark verflüssigt und das Mycel sank unter; am Rande des verflüssigten Teiles zeigte sich jedoch bald neues Wachstum, das in dem Maße weiter fortschritt, als das alte Mycel untersank. Eine vierte und fünfte Impfung hatte zur Folge, daß das Mycel nicht mehr untersank und nun entwickelte sich ein prachtvolles, violettes Luftmycel, das sich in dichtem, flaumigem Rasen rasch ausbreitete. Seine Farbe ist etwas heller wie die des Fruchtkörpers. Schnallen wurden häufig gebildet. Die Dicke der Fäden schwankt zwischen 2 und 5 μ; der Inhalt ist hyalin und homogen. Oidienbildung fehlte vollkommen, auch Kristallausscheidung.

An Brot paßte sich der Pilz nur sehr schwer an. Die Versuche, Fruchtkörperbildung anzuregen, waren lange erfolglos, bis sich bei zwei Kulturen, welche am 16. März 1909 angelegt worden waren, im Herbste 1909 eine Menge kleiner, doch deutlicher Fruchtkörper zeigten (Tafel I Fig. 13 [Phot. einer der beiden Kulturen]).

Hydnum imbricatum.

Gefunden in den Wäldern bei Planegg (bei München). Bestimmt nach Michael I, No. 20; Rabenhorst 1884, Seite 384.

Brefeld hat von der Gattung *Hydnum* mehr als zwölf Arten in Kultur genommen; die Sporen keimten jedoch bei keiner einzigen. Mycolog. Untersuchungen, Heft VIII, Seite 22. Duggar gelangen Kulturen von *Hydnum coralloides* bis zur Fruchtbildung.

Die Sporen keimten auf Humus; auf Nährgelatine trat gleichfalls Keimung ein, das Mycel starb jedoch bald nach der Keimung ab. Mit dem auf Humus gut gediehenen Mycel wurden Impfungen auf Gelatine ausgeführt, teils ohne, teils mit Säure. Das Mycel wuchs auf beiden Substraten, doch besonders auf dem angesäuerten sehr langsam. Impfungen auf Brot mit und ohne Säure zeigten dasselbe Ergebnis. Die Gelatine wurde fast gar nicht verflüssigt. Da hier allem Anschein nach die Säure schädlich wirkte, machte Verfasser die schon erwähnten Versuche mit neutralisiertem Substrat. Das Ergebnis war, wie angegeben, negativ. Die Angabe Küsters[1]), daß die Gelatine von Mikroorganismen durch Ausscheidung tryptischer Fermente verflüssigt werde, trifft für die Hymenomyceten nicht zu. Verfasser hat bei allen untersuchten Kulturen nur bei *Hydnum imbricatum* geringe, sonst reichliche Säureausscheidung mit Lackmus feststellen können. Da die tryptischen Fermente nur in alkalischem Medium wirksam sind, kann es sich hier nur um Pepsine handeln.

Das Mycel von *Hydnum imbricatum* ist rein weiß und ungemein zart; die Dicke schwankt zwischen 1,3 und 3,5 μ. Die Septierungen sind erst bei inhaltslosen Hyphen deutlich zu erkennen. Schnallenbildungen fehlten. Kristalle wurden in großen Mengen ausgeschieden. Anastomosen waren nicht selten. Der Pilz bildet Oidien, doch offenbar erst nach längerem Wachstum und unter besonderer Verhältnissen. Monate alte Brotkulturen blieben frei von Oidien, während sie in einer drei Wochen alten Humuskultur massenhaft

[1]) Küster: Anleitung zur Kultur von Mikroorganismen, Seite 35 und 82. Leipzig und Berlin 1907.

auftraten. *Hydnum imbricatum* scheidet beim Wachstum auf Brot eine schwach sauer reagierende gelbe Flüssigkeit in Tropfenform aus. Beim Wachstum auf neutralisiertem Substrat bildete der Pilz Ringe, ähnlich denen von *Penicillium*.

Coprinus papillatus.

Aus Mist gezogen im Juli 1908. Bestimmt nach Rabenhorst 1884, Seite 628.

Copr. pap. wurde von Brefeld nicht kultiviert; auch nicht von anderen, soweit Verfasser bekannt.

Der Hut ist anfangs eiförmig, dann glockenförmig, schließlich schirmförmig und ausgebreitet, braun, später grau und mit braunen Papillen besetzt, ca. 1 cm breit. Länge des weißen Stiels ca. 4—8 cm. Sporen braunschwarz, 10—13 μ lang, 5—7 μ dick.

Die Sporen keimten ungemein leicht, schon nach einem bis zwei Tagen, und verloren ihre Keimungsfähigkeit auch durch Austrocknen nicht ganz, wie schon erwähnt.

Das Mycel wächst gut auf Mist; die Dicke schwankt zwischen 1,7 und 3,4 μ. Die Septierungen sind deutlich zu sehen und häufig mit Schnallen besetzt. Nach zirka vierzehn Tagen beginnt die Fruchtkörperbildung in Form von kleinen, braunen, kaum nadelkopfgroßen Höckerchen. Schon zwei Tage später ist der Fruchtkörper entwickelt. Die Zahl der Fruchtkörper wächst sehr schnell, so daß das Substrat wie von ihnen erfüllt erscheint. Dies steht im Widerspruch mit dem nicht allzu häufigen Auftreten derselben in der Natur, dürfte jedoch dadurch zu erklären sein, daß die Konkurrenz mit anderen Pilzen und mit Bakterien bei der künstlichen Kultur wegfällt. Viele Fruchtkörper entstehen im Innern des Substrates in Hohlräumen und bleiben da auf halber Entwicklung stehen.

In einer später untersuchten Kultur waren — analog anderen Pilzen — absolut keine Schnallen zu entdecken. Sklerotienbildung und Oidien fehlten.

Coprinus micaceus.

Gezogen aus einem Blumentopf im Nov. 1908.

Bestimmt nach Rabenhorst 1884, Seite 629.

Coprinus micaceus wurde von M. Ferguson[1]) kultiviert.

Der Hut ist anfangs eiförmig, dann glockenförmig, gelbbraun, zwei bis vier Zentimeter breit, mit dunklen Körnchen belegt. Der Stiel ist 8—12 cm lang, 4—8 mm dick. Sporen braun, 7—8 μ lang, 4—6 μ dick.

Die Sporen keimten auf Nährgelatine nach wenigen Tagen und wurden teils auf Erde, teils auf Erde und Mist ausgelegt. Das Wachstum war reichlich. Das Mycel ist deutlich septiert, hyalin, 1,5—4 μ dick, ohne Schnallenbildung und Nebenfruktifikation. Makroskopisch betrachtet hat es ein wolliges, gespinstartiges Aussehen von oft gelber Farbe. Dieses Aussehen wird dadurch bedingt, daß die Hyphen die Neigung besitzen, sich zu Strängen zusammenzulegen.

Die Fruchtkörperbildung trat bei diesem *Coprinus* viel später ein als bei den andern, nach etwa zwei Monaten. M. Ferguson erwähnt in der zitierten Arbeit, daß bei ihren Kulturen von *Coprinus micaceus* auf Bohnenschoten, faulem Holz und dergl. Keimung nach sechs bis zwölf Stunden und Fruchtkörperbildung nach etwa drei Wochen eingetreten sei.

Coprinus nycthemerus.

Aus Mist gezogen im Okt. 1908. Bestimmt nach Rabenhorst 1884, Seite 626.

Coprinus nycthemerus wurde von Brefeld nicht kultiviert. Mycolog. Untersuchungen, Heft VIII, Seite 38.

Die Bestimmung des *Coprini* stößt auf Schwierigkeiten hauptsächlich deshalb, weil die Fruchtkörper und selbst die Sporen ein und derselben Art oft großen Veränderungen unterworfen sind. Erst die Kultur

[1]) M. Ferguson: „A preliminary study of the germination of the spores of Agar. camp. and other Basidiomycetes Fungi." U. S. Depart. of Agric. 1902.

kann da vollen Aufschluß geben. So hat Brefeld die fast völlige Gleichheit von *Coprinus niveus* und *Copr. lagopus* erkannt, während sie Rabenhorst noch zu ganz verschiedenen Gruppen rechnet, *Coprinus lagopus* zu den *Veliformes*, *Coprinus niveus* zu den *Pelliculosi*.

Der vorliegende Pilz hat anfangs zylindrischen, dann glockenförmigen, endlich ausgebreiteten und am Rande umgebogenen Hut; er ist anfangs weiß und mit kleinen Zöttchen besetzt, mit bräunlichem Zentrum; später wird er dunkelgrau infolge des Verlustes der Zöttchen und zerschlitzt. Breite des Hutes sehr variabel, schwankend zwischen 4 mm und 4 cm, ebenso die Länge des Stieles zwischen 5 cm und 20 cm. Dicke des Stieles 1—4 mm, Farbe weiß. Auch die Größe der Sporen ist schwankend; neben länglichen mit 10—15 μ Länge und 5—8 μ Dicke sind rundliche nicht selten mit ca. 8 μ Durchmesser. Die Farbe der Sporen ist, makroskopisch betrachtet, schwarz, mikroskopisch dunkelbraun.

Die Sporen keimten in einigen Tagen. Das Mycel ist hyalin, oft reich an Vakuolen; in den Kulturen war es stets sehr spärlich entwickelt. Die Dicke der Hyphen schwankt zwischen 2 und 4 μ. Schnallenbildung war häufig in allen Kulturen. Oidienbildung, ebenso Sklerotien fehlten, auch Stäbchenbildung, wie sie Brefeld bei einigen *Coprini* beschreibt, die dem *Coprinus nycthemerus* sehr ähnlich sind.[1]) Die Fruchtkörper entwickeln sich in ihren ersten Anfängen stets etwa vierzehn Tage nach der Aussaat der Sporen. Von der Anlage der Fruchtkörper bis zu ihrer völligen Ausbildung vergehen zwei bis drei Tage. Die völlige Streckung des Stieles und die Entfaltung des Hutes erfolgt während der Nacht.

Auffallend ist die große Verschiedenheit der Fruchtkörper. Neben ganz kleinen, mit etwa 4 mm Hutdurchmesser, kamen solche mit 4 cm Durchmesser vor und dazwischen alle möglichen Übergänge. Daß dies auch bei anderen Arten vorkommt, zeigt neben den Angaben Rabenhorsts die Beobachtung Brefelds bei *Coprinus lagopus*, von dem er erwähnt, daß es ihm schwer fiel, ihn an den verschiedenen Fruchtkörpern immer wieder zu erkennen.[2])

Die Aussaat der Sporen eines großen Fruchtkörpers ergab wieder große und kleine Fruchtkörper. Die Verschiedenheit ist also wohl darauf zurückzuführen, daß das Nährmaterial anfangs recht reichlich zur Verfügung steht, bald aber verbraucht wird und dann nur mehr zur Ausbildung kleiner Fruchtkörper ausreicht. Tatsächlich waren in den beobachteten Fällen die kleinen Fruchtkörper zuletzt ausgebildet worden.

C. Vereinigung von Pilz und Wurzel und deren Ergebnisse.

I. Allgemeines.

Wenn auch zugegeben werden muß, daß Laboratoriumsversuche nicht unbedingt entscheidend in biologischen Fragen sein können, so ist doch die künstliche Kultur der einzige Weg, bestimmte Anhaltspunkte über den Vorgang der Mycorhizenbildung zu bekommen.

Fast alle bisher in der Mycorhizenfrage unternommenen Arbeiten beschränkten sich auf die Untersuchung schon vorhandener Mycorhizen; die wenigen schon erwähnten Versuche der Erzeugung von Mycorhizen auf künstlichem Wege sind nicht beweiskräftig aus den angeführten Gründen. Die synthetischen Versuche mit Pilzen, die man von Anfang an in Beziehung zu Phanerogamenwurzeln brachte (*Elaphomyces*, *Tuber*, *Geaster*) scheiterten daran, daß die Sporen nicht keimten.

Verfasser hat zum Zweck einleitender Versuche viele Mycorhizen von Abietineen untersucht und dabei einige Erscheinungen von Interesse beobachtet.

Bei der Gabelmycorhiza von *Pinus Strobus* ließen sich drei Zonen unterscheiden: eine helle Spitze

[1]) Es sind das *Coprinus niveus* und *Coprinus lagopus*.

[2]) Brefeld: Mycolog. Untersuchungen III. Heft, Seite 98.

(Hartigsche „Spargelspitze"), dann eine kurze Zone mit hellbrauner Farbe, die endlich gegen das basale Ende zu in eine dunkelbraune Zone überging. An Schnittserien vom apikalen Ende bis zum basalen fiel dem Verfasser auf, daß in den meisten Fällen zuerst die ektotrophe Mycorhiza auftrat, dann erst die endotrophe, wenn sie überhaupt vorkam. Die ektotrophe Mycorhiza trat weit häufiger auf als die endotrophe und in vielen Gabeln fehlte die letztere. In seltenen Fällen kommen beide zusammen vor.

Möller hat in seiner schon angeführten Arbeit die endotrophe Mycorhiza der gemeinen Kiefer zuerst beschrieben: „Pilzfäden von verschiedener, meist aber zwischen 4 und 7 μ schwankender Stärke durchziehen die Rindenzellen, dringen von einer zur andern und verzweigen sich im Innern der Zellen auf mannigfaltige Art. Oft entsteht plektenchymatisches Gewebe, oft sieht man unregelmäßig verschlungene Fadenknäuel oder verbogene und verschiedenartig verdickte Fäden." An anderer Stelle bildet Möller endotrophe Pilzfäden ab und erwähnt, daß sich diese nur in gebräunten Zellen finden, in denen jedoch häufig noch der intakte Zellkern erhalten sei (Zeitschr. für Forst- u. Jagdw. 1903, S. 324). v. Tubeuf hat darauf hingewiesen, daß diese Zellen nicht mehr als lebend betrachtet werden können. Die Anwesenheit eines intakten Zellkerns kann als kein Beweis einer bestehenden Vitalität der Zellen angesehen werden. Wie groß der Widerstand der Zellkerne sein kann, zeigen die Beobachtungen von Werner Magnus[1]) bei seinen Studien über endotr. Mycorhiza von Neottia: „Welch großen Widerstand der Kern einer spontanen Auflösung entgegensetzt, konnte oft an faulenden Pflanzenteilen oder im Herbste an abgefallenen Blättern beobachtet werden, in denen der Kern oft lange Zeit die Degeneration des gesamten übrigen Plasmas überlebt."

Verfasser hat normale endotrophe Pilzfäden immer nur in gebräunten Zellen gefunden, in Zellen also, die nicht mehr als lebensfähig angenommen werden konnten. Damit aber konzentriert sich die Bedeutung der endotrophen Pilzwurzel bei den Abietineen auf die verhältnismäßig seltenen Fälle der Hyphendegeneration. Die Verschiedenheit der intrazellularen Hyphen ist sehr in die Augen fallend und ihr Auftreten an eine gewisse Gesetzmäßigkeit gebunden. Regelmäßig waren in allen untersuchten Mycorhizen die deformierten Hyphen, wenn sie überhaupt auftraten, näher dem basalen Ende des Ästchens, also in einer älteren Schicht zu finden. Zuerst zeigten sich einzelne normale Hyphen, die regellos die gebräunten Rindenzellen durchzogen, bis plötzlich beim nächsten Schnitt — es konnte sich nur um einen Bruchteil eines Millimeters handeln — die Fäden zum Teil nicht mehr in gebräunten, sondern in lebenden Zellen mit unvergilbten Zellwänden zu sehen waren und ein völlig andres Aussehen zeigten: die Wände waren dünner geworden, der Inhalt völlig hyalin, öfters ganz verschwunden, die Gestalt buckelig und verquollen; oft waren die Gebilde — Fäden konnte man sie nicht mehr nennen — zu einem Haufen vereinigt, so daß eine Art Plektenchym zustande kam (Tafel I Fig. 14).

Es ist damit eine gewisse Ähnlichkeit mit den Vorgängen in den Verdauungszellen der Orchideen gegeben, die nach W. Magnus[2]) mit einer Degeneration des Pilzes eingeleitet werden: „Die auffallende Ähnlichkeit der krampfadrigen Verzweigungen und Buckelungen mit den Sporangiolen Jansés läßt vermuten, daß es sich um Degenerationsprodukte des Pilzes handelt, die von der Pflanze erzogen werden, um von ihr später aufgelöst und zu ihrer Ernährung verwendet zu werden."

Auch von Schlicht[3]) wurden ähnliche Gebilde und zwar bei *Ranunculus acris* und bei *Paris quadrifolia* gefunden.

Im vorliegenden Falle läßt sich die Erscheinung in folgender Weise erklären: Die Hyphen dringen in die äußeren Rindenzellen ein, die gebräunt und nicht mehr lebend sind. Meist gelingt es ihnen nicht, auch in die lebenden Zellen einzudringen, erlangen keine besondere Bedeutung und verschwinden wieder. Manchen gelingt es jedoch, einzudringen und nun spielt sich der bei der endotrophen Mycorhiza schon beschriebene Kampf zwischen Wirt und Gast ab, wobei die Wirtspflanze Sieger bleibt.

[1]) Werner Magnus: Studien über endotrophe Mycorhiza von Neottia Nidus avis. Jahrb. für wiss. Bot. 1900, S. 205.
[2]) W. Magnus: Studien über die endotrophe Mycorhiza von Neottia Nidus avis. Jahrb. für wiss. Bot. 1900, Seite 213.
[3]) Schlicht: Beitrag zur Kenntnis der Verbreitung und der Bedeutung der Mycorhiza 1889. Inaug.-Dissertation.

Reste von getöteten Hyphen konnte Verfasser nicht mit Sicherheit feststellen; ob gewisse gelbliche Rudimente, die nicht selten zu sehen waren, als solche zu betrachten sind, bleibt fraglich. Knäuelbildung, wie sie etwa der Ericaceentypus in den Epidermiszellen oder der Orchideentypus in den Pilzwirtzellen der Rinde darstellen, kommt nicht vor.

In einem Falle war gegen das basale Ende zu ein fast völliges Verschwinden der ektotrophen Mycorhiza — sie allein war in diesem Falle vorhanden — zu verfolgen: kein interzellulares Mycel, kein Mantel; nur an einer einzigen Stelle hatte sich eine Hyphe zwischen zwei Zellen hindurchgeschoben.

Auch in Wurzelhaaren und zwar von *Pinus Strobus* hat Verfasser Hyphen gefunden, zuerst in verletzten, dann auch in intakten, lebenden. Auch v. Tubeuf[1]), Sarauw[2]), Burgeff[3]) haben, letzterer in Wurzelhaaren von Orchideen, diese Beobachtung gemacht. Die Hyphen dringen aus den Rindenzellen in die Wurzelhaare ein. In zwei Fällen war das Eindringen interzellularer Hyphen in das Zellinnere von *Pinus Strobus* festzustellen (Tafel II Fig. 15). Solche Haustorien haben ebenfalls schon v. Tubeuf[1]) und Sarauw[2]), ersterer an *Pinus silvestris*, letzterer an *Fagus* festgestellt und abgebildet, neuerdings auch Peklo[4]) an *Monotropa hypopitys*. Sie sehen den deformierten intrazellularen Hyphen ziemlich ähnlich, so daß die Vermutung berechtigt erscheint, daß die endotrophe Mycorhiza bei den Abietineen eine Nebenform der ektotrophen darstellt. Dagegen spricht nur die außerordentliche Seltenheit dieser Erscheinung.

Verfasser hat ferner bei *Pinus Strobus* einige Fälle beobachtet, wo der Pilzmantel vollkommen fehlte, jedoch interzellulares Mycel vorhanden war (Tafel I Fig. 14).

Wie Beobachtungen Peklos an *Monotropa hypopitys* zeigen, kommt dies auch dort vor. Sarauw erwähnt noch in der zitierten Arbeit *Juniperus* und *Cedrus Deodara* als einzige bekannte Fälle. In anderen Fällen war der Mantel nur an einer Stelle des Querschnittes entwickelt. Bemerkenswert sind haarartige Fortsätze, die der Mycelmantel einer im Mai 1909 untersuchten *Abies-Mycorhiza* aufwies. Diese „Mycelhaare" sind septiert und haben stark verdickte Wände (Tafel II Fig. 16). Sie sind offenbar sekundäre Bildungen; bei einem „Haar" war deutlich zu sehen, daß es aus einer „Zelle der äußersten Plektenchymschicht entsprang. Noack[5]) hat solche Mycelhaare bei Kiefern und Fichten beobachtet.

II. Die Synthese.

Zur Vornahme der Synthese standen im Frühjahre 1909 eine Reihe von *Pinus Strobus-*, *Abies pectinata-* und *Picea excelsa*-Pflänzchen zur Verfügung. Von dreiunddreißig gesammelten und zum Zweck der Kultur behandelten Pilzarten war die dauernde Kultur bei zehn Arten gelungen. Der Verlauf der Kulturen ist im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Bei der Suche nach einem passenden Substrate für die Vereinigung der mutmaßlichen Symbionten boten sich einige Schwierigkeiten. Denn da für die Abietineen Brot und Nährgelatine ebenso ungeeignet sind wie Sand für die Pilze, kam nur Humus als geeignet in Betracht. Der Umstand, daß es Frank nicht gelungen ist, auf sterilisiertem Humus gesunde Pflänzchen zu erzielen, konnte nicht störend wirken, wenn seine Meinung, daß das Fehlen der Mycorhizenpilze daran schuld gewesen sei, richtig ist. Nun hat aber Möller gerade im Humus pilzfreie Wurzeln der Kiefer gefunden und es ist infolgedessen anzunehmen, daß die Kiefern wenigstens ganz gut ohne Mycorhizen auskommen

---

[1]) v. Tubeuf: Beiträge zur Mycorhizafrage. Naturw. Zeitschr. für Land- und Forstwirtschaft 1903, 2. Heft.

[2]) Sarauw: Sur les Mycorhizes des arbres forestiers et sur le sens de la symbiose des racines. Extrait de la revue mycologique 1903.

[3]) Burgeff: Die Wurzelpilze der Orchideen, Jena 1909.

[4]) Peklo: Die epiphytischen Mycorhizen nach neuen Untersuchungen. Bulletin internat. de l'Akademie de sciences de Bohéme 1908, Seite 87.

[5]) Noack: Über Mycorhizen bildende Pilze. Bot. Zeitung 1889, Seite 389.

können, wenn man doch schon an einen direkten Nutzen der Pilze glauben will. Die Versuche von v. Tubeuf und Nobbe beweisen das Auskommen ohne Pilze auch für die Fichten und Lärchen.

Die Vermutung blieb jedoch bestehen, daß die Pflänzchen in dem sterilisierten Humus infolge der durch die Sterilisation eingetretenen Zersetzungen keine günstigen Wachstumsbedingungen finden würden, umsomehr, als Verfasser im Sommer 1908 nur zwei kümmerliche Pflänzchen auf Humus erzielen konnte, die von der Synthese ausgeschlossen wurden. Um den Pflänzchen ein sicheres Gedeihen zu ermöglichen, wurde deshalb Knopsche Lösung hinzugefügt. Dadurch waren jedoch wieder Bedenken in bezug auf das Gedeihen der Pilze gegeben. Denn Ca $(NO_3)_2$, KCl und Mg SO_4 wirken, wie Stahl in seiner Arbeit über den Sinn der Mycorhizenbildung, Seite 620, angibt, abstoßend auf die Hyphen. Versuche, die mit reiner Gelatine, welcher Knopsche Lösung beigefügt war, angestellt wurden, ergaben, daß obige Salze, in der Verdünnung der Knopschen Lösung wenigstens, das Wachstum nicht hindern. Das erfolgte spärliche Gedeihen dürfte auf den Kohlenstoffmangel zurückzuführen sein.

Die Vereinigung von Pilz und Wurzel[1]) wurde in der Weise vorgenommen, daß die Pflänzchen teils in die Humuskulturen der betreffenden Pilze nebst Zugabe Knopscher Lösung versetzt wurden, teils in den frisch sterilisierten Humus mit nachträglicher Hinzugabe des Pilzes. Die erstere Methode bewährte sich nicht; trotzdem das durch das Mycelwachstum zusammengeballte Substrat gelockert worden war, gediehen die Pflänzchen nur anfangs und starben dann ab; auch der Pilz stellte in einigen Fällen sein Wachstum ein. Ob beides auf Erschöpfung des Substrates und letzteres besonders doch auf die Zugabe der Knopschen Lösung zurückgeführt werden muß, ist nicht zu entscheiden. Sicher ist, daß einige Pilze trotz Zugabe Knopscher Lösung ganz gut gediehen. Versuche mit ganz jungen Keimlingen, die eine Berührung schon der Keimwurzel mit den Mycelien bezweckten, hatten keinen Erfolg.

Die erste Synthese wurde am 1. Februar 1909 vorgenommen zwischen einem sechs Monate alten *Pinus Strobus*-Pflänzchen und *Collybia macrourus*, versuchsweise auf Brot. Die Wurzel wurde so orientiert, daß sie an die Glaswand zu liegen kam, um eine Beobachtung zu ermöglichen. Das Kölbchen wurde mit schwarzem Papier im unteren Teil umhüllt. Da die Möglichkeit immerhin besteht, daß die ektotrophen Pilze eine Stickstoff vermittelnde Rolle spielen, wurde der Stickstoff der Knopschen Lösung Ca $(NO_3)_2$ weggelassen. Schon nach wenigen Tagen war deutlich ein Hinwachsen der Hyphen zur Wurzel zu sehen, auch da, wo die Wurzel nicht in Berührung mit dem Substrat war. Am 9. Februar war die Wurzel äußerlich vollständig verpilzt mit Ausnahme einiger Stellen. Am 15. Februar wurde das Pflänzchen aus dem Kölbchen genommen. Neubildungen waren nicht vorhanden, das Pflänzchen sah gesund aus. Die mikroskopische Untersuchung zeigte starke Verpilzung der gebräunten Zellen. Doch nicht weit von der Spitze zeigten auch einige innere Zellen ohne Bräunung den Pilz und zwar degeneriert (Tafel II, Fig. 18).

Der Pilz präsentierte sich da in der schon Seite 17 erwähnten Form, wie sie Verfasser bei natürlichen Mycorhizen vielfach beobachtet hat und die Möller „verbogene und verschiedenartig verdickte Fäden" nennt. Es war dies von allen Synthesen der einzige Fall von Hyphendegeneration. Es handelte sich hier wie bei allen ähnlichen Fällen offenbar um einen direkten Angriff des Zellplasmas auf den Pilz. Eine weitere Art, wie sich das Zellplasma gegen den Eindringling zu schützen scheint, wird a. a. Ort zu besprechen sein. Auch in den gebräunten Zellen der Hauptwurzel fanden sich Hyphen. Das Dickenwachstum derselben hatte schon begonnen, die sekundären Gefäßteile waren bereits zu erkennen, doch war der Cambiumring noch nicht kreisförmig geworden. Eine Hypertrophie von Zellen oder Zellkernen war nirgends vorhanden.

Am 6. März wurde eine zweite Synthese vorgenommen zwischen einem acht Monate alten, steril gezogenen Pflänzchen von *Pinus Strobus* und *Hydnum imbricatum* ebenfalls in Brotkultur. Die Untersuchung wurde am 14. April vorgenommen. Sie zeigte, daß sich an einer Seitenwurzel sechs Höckerchen neu gebildet hatten; Gabelbildung war nicht eingetreten. Die mikroskopische Untersuchung ergab völlige Abwesenheit der ektotrophen Mycorhiza: kein Pilzmantel, kein interzellulares Mycel. Die Hyphen bedeckten an einigen Stellen des Querschnittes lose die Wurzel; doch ein Eindringen derselben konnte nirgends festgestellt werden. Intrazellulare Hyphen waren zu sehen, doch nur in gebräunten Zellen.

[1]) Beispiel zweier Synthesen Tafel II, Fig. 17 (Phot.).

Eine dritte Synthese vom 10. März zwischen einem neun Monate alten *Pinus Strobus*-Pflänzchen und *Lactarius deliciosus* auf Humus wurde am 19. April untersucht. Die Wurzeln wiesen zahlreiche Neubildungen auf. Ein Seitenästchen hatte das Aussehen einer typischen Mycorhizagabel. Die nähere Untersuchung ergab jedoch monopodiale, nicht dichotome Verzweigung und vollkommene Freiheit von Pilzfäden. Bei Untersuchung der übrigen Neubildungen erwiesen sich die meisten als pilzfrei; bei dreien waren intrazellulare Hyphen in gebräunten Zellen zu sehen.

Die Untersuchung der übrigen Synthesen, alle auf Humus ausgeführt, wurde im Herbste vorgenommen, da dann nach einer Versuchsdauer von über einem halben Jahre mit mehr Sicherheit geurteilt werden konnte. Sie brachte in bezug auf die Mycorhizenbildung nichts Neues. Nirgends war interzellulares Mycel nachzuweisen. Die Pflänzchen waren mit Ausnahme von zweien gesund geblieben. Im ganzen wurden zweiunddreißig Synthesen untersucht.

Im Laufe der Untersuchungen zeigten sich einige auffallende Erscheinungen, die hier mitgeteilt sein mögen. Bemerkenswert ist, daß sich intrazellulare Hyphen einige Male auch in der Rinde des hypocotylen Gliedes bis zu den Cotyledonen vorfanden, sowohl bei in der Natur gewachsenen Pflänzchen, als auch bei steril gezogenen und zwar bei *Picea* und *Abies*. Die Hyphen hatten bei letzteren ein anderes Aussehen als die des Impfpilzes.

Eine auffallende Erscheinung brachte ferner eine Synthese zwischen einem sechs Monate alten *Pinus Strobus*-Pflänzchen und *Lactarius deliciosus*. Die gebräunten Rindenzellen der Wurzel waren von den Hyphen des Impfpilzes kreuz und quer durchwachsen; aus den äußeren Zellen waren die Pilzfäden vielfach in die Wurzelhaare eingedrungen. Obwohl nun die Kultur von anderen Keimen völlig verschont geblieben war, war eine Reihe von Zellen vorhanden, in die aus den Interzellularen kurze Hyphen eingedrungen waren, von ganz anderem Aussehen, als das des Impfpilzes. (Tafel II Fig. 19.)

Eine *Abies*-Wurzel aus einer Synthese mit *Coprinus micaceus* zeigte dieselbe Erscheinung. Ferner waren einigemale in der Wurzelrinde von *Pinus Strobus*- und *Picea*-Pflänzchen zäpfchenartige Gebilde zu sehen, die in das Zellumen vordrangen. Im Verlaufe der Zäpfchen war stets ein enges Lumen zu verfolgen (Tafel II Fig. 20). Die Lichtbrechung dieser Gebilde entsprach der der Zellwände; Behandlung mit Chlorzinkjod ergab schwache Blaufärbung. Vermutlich handelte es sich hier um getötete, in das Zellumen eingedrungene Hyphen, gegen die das Zellplasma sich in der Weise schützte, daß es einen Zellulosemantel um sie bildete; dieser preßte dann die Hyphen fast bis zum Verschwinden des Lumens zusammen. Diese Zäpfchen waren in verschiedener Größe gebildet und traten öfters zu mehreren in einer Zelle auf. Die eingehendste Untersuchung der Substrate und der Peripherie der Wurzeln ergab kein fremdes Mycel.

Diesen Wahrnehmungen seien noch einige andere angeschlossen, die Verfasser schon früher gemacht, jedoch nicht zu deuten vermocht hatte. Bei Gelegenheit einer Schnittserie durch die Wurzel eines steril gezogenen, vierzehn Tage alten *Pinus Strobus*-Pflänzchens zeigten sich in zwei Zellen der Rinde zweier Querschnitte je eine große, mauerförmige Dauerspore. Sie schienen einer zu den Pleosporeen zu rechnenden *Alternaria*-Art anzugehören. Das deutlichste Bild der Sporen zeigte sich bei scharfer Einstellung der Zellwände (Tafel III Fig. 23). Hyphenreste konnten nicht festgestellt werden. An einigen anderen Stellen zeigten sich Sporen, die nicht in Zellen lagen. Es ist also möglich, daß es sich hier um Sporen handelte, die durch Zufall in die Zellen zu liegen gekommen waren. Dagegen spricht jedoch der Umstand, daß auch die übrigen Sporen innerhalb der Rinde lagen und außerhalb derselben nirgends eine Spur von ihnen zu entdecken war.

Bei Gelegenheit von *Picea*-Kulturen in unsterilisiertem Humus zeigte sich in einem Schnitte durch eine vierzehn Tage alte Wurzel in einer Rindenzelle neuerdings eine Dauerspore, die einer Brandspore täuschend ähnlich sah. Auffallend war, daß das warzige Epispor bei nochmaliger Untersuchung nach einigen Tagen glatt geworden war (Tafel II Fig. 22). Endlich fanden sich noch zwei Sporen in der Rinde einer zwei Monate alten, steril gezogenen *Pinus Strobus*-Wurzel, wegen ihres Zusammenhanges mit anderen

Beobachtungen wohl die auffallendste Erscheinung. Die eine der Sporen lag mitten in einer Zelle, die andere seitlich, aber noch in der Rinde (Tafel II, Fig. 21). Bemerkenswert ist, daß die Zelle, in welcher die Spore lag, bedeutend größer war als die umgebenden; eine zweite größere Zelle befand sich neben der zweiten Spore, so daß wohl auch diese in der größeren Zelle gelegen, durch das Schneiden jedoch herausgerissen worden war. Das Interessanteste ist nun die frappierende Ähnlichkeit der zwei Sporen mit den von Neger[1]) in Tannensamen gefundenen und abgebildeten Sporen. Alles stimmte überein, die Form, die Größe (25 μ Durchmesser) und die Farbe, die zwischen hell- und dunkelbraun schwankte. Die Sporen Negers gehören einem *Urocystis*-ähnlichen Pilz, einer *Hypomyces*-Art an. Neger hält ihn für keinen Parasiten, sondern glaubt, daß er sich sekundär auf dem ihm vorliegenden verkümmerten Tannenendospermen angesiedelt hat und zwar deshalb, „weil man in zahlreichen dickschaligen Samen ebenso verkümmerte Rudimente des Embryo und Endosperms findet, ohne eine Spur von Mycelfäden oder Sporen."

Damit hatte hohe Wahrscheinlichkeit erlangt, was schon anfangs vom Verfasser vermutet worden war: daß der Pilz im Pflänzchen unter Umständen seine Herkunft gar nicht vom Substrat, sondern vom Samen ableitet. Im Zusammenhange damit, daß sich auch im hypocotylen Gliede Hyphen gezeigt hatten — auch Möller[2]) hat sie dort gefunden, allerdings nicht in steril gezogenen Pflänzchen — ist zu vermuten, daß es sich hier um einen Parasiten handelt, der im Samen ausdauert, um dann im Pflänzchen eine Krankheit hervorzurufen. Tatsächlich war einmal in einer sterilen Kolbenkultur ein *Pinus Strobus*-Pflänzchen an den Cotyledonen erkrankt und dann abgestorben. Da zu jener Zeit obige Beobachtungen noch nicht gemacht worden waren, war die Erkrankung auf einen trotz aller Vorsicht eingedrungenen Parasiten zurückgeführt und das Pflänzchen nicht untersucht worden.

Es ist eine Frage für sich, wie der Pilz in den Samen kommt. Seit den Untersuchungen Brefelds über die Blüteninfektion des Weizens durch *Ustilago Tritici*, ferner seit denen Nestlers über *Lolium temulentum*, der nachwies, daß das in der hyalinen Schicht des Samens vorkommende Pilzmycel sich durch die ganze Pflanze verbreitet, könnte man sogar an eine Blüteninfektion denken, obwohl es wahrscheinlicher ist, daß die Sporen als solche bei der Samenbildung mit eingeschlossen werden.

Da bei den Koniferen die Samenanlagen nackt sind, können etwa hinzugeflogene Pilzkeime leicht in den sich entwickelnden Samen kommen.

Auch die Samenkeimung bot Auffälliges und zwar bei *Pinus Strobus* in drei Fällen. Die Samenschale wurde gesprengt und das Endosperm quoll bis zum Doppelten des ursprünglichen Volumens an. Die Untersuchung ergab einen Hohlraum zwischen Endosperm und Embryo. Die Zellen des Endosperms wiesen keine auffallenden Veränderungen auf, hingegen die des Embryos, der makroskopisch völlig normal aussah. In ihnen waren vielfach Ringe zu sehen, ähnlich denen quer durchschnittener Hyphen; der Zellkern war stets degeneriert, entweder überhaupt nicht mehr zu erkennen oder nur mehr in körnchenartigen Rudimenten vorhanden.

III. Mycorhizenbildung an wenige Wochen alten, in unsterilisiertem Humus gewachsenen Picea-Pflänzchen.

Um über die Entstehung der ektotrophen Pilzwurzel Näheres zu erfahren, hat Möller im Frühjahre 1902 Wurzeln von Kiefern nach der Keimung alle zwei Tage untersucht. Er richtete sein Augenmerk nur auf die Bildung von Gabelästchen und stellte die erste Andeutung derselben etwa sieben Wochen nach der Keimung fest. Nun kommt aber ektotrophe Mycorhiza auch ohne Bildung von Gabelästchen vor, wie er selbst angibt in der zitierten Arbeit 1903 Seite 323: „Deswegen kann man leider, wo die Gabeln fehlen,

[1]) Neger: Beobachtungen und Erfahrungen über Krankheiten einiger Gehölzsamen. Thar. forstl. Jahrbuch 1909, Bd. 60, Seite 222—252.

[2]) Möller: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märk. Sandboden 1902, Seite 209.

mit bloßem Auge oder mit Hilfe der Lupe noch nicht das Fehlen der ektotrophen Mycorhiza feststellen" und kurz vorher ist erwähnt, daß dieselbe häufig auch an kurz bleibenden Seitenwurzeln der Kiefer vorkommt, die nicht gegabelt sind. Ein Beweis des ersten Auftretens der Mycorhiza war also mit dieser Feststellung noch nicht gegeben.

Um zu untersuchen, ob etwa schon in die junge Keimwurzel ein Eindringen stattfindet, wurden im Januar 1910 sterilisierte Samen von *Picea excelsa* auf unsterilisiertem Humus ausgelegt. Die Samen waren im Herbste 1909 gesammelt worden, der Humus stammte aus einem Fichtenwalde. Die Keimung erfolgte rasch; schon nach vierzehn Tagen waren fast alle gekeimt. Nach weiteren acht Tagen wurden die Pflänzchen, deren Samen zuerst gekeimt waren, herausgenommen zur Untersuchung, ob etwa schon Pilzfäden mit ihnen in Berührung getreten waren. Die Schnitte wurden hier wie auch bei den späteren Untersuchungen mit dem Gefriermikrotom ausgeführt. Nachdem sich bei zweien keine Spur einer Infektion gezeigt hatte, ergab die Untersuchung des dritten das überraschende Resultat, daß Pilzhyphen schon interzellular in die äußerste Rindenschicht eingedrungen waren. Die Epidermis war schon abgestoßen; an verschiedenen Stellen waren die charakteristischen Ringe der quer durchschnittenen Hyphen zwischen den Zellen zu sehen.

Die Stelle, an welcher sich das infizierte Pflänzchen befunden hatte, wurde markiert und nach weiteren acht Tagen wurden drei Pflänzchen in nächster Nähe der markierten Stelle untersucht. Alle drei zeigten Infektion; sie war nicht viel weiter vorgeschritten als beim ersten (Tafel III Fig. 24).

Nach weiteren acht Tagen wurden ohne Erfolg acht Pflänzchen untersucht, bis endlich bei zweien sich wiederum Pilzinvasion feststellen ließ. Die Infektion war bedeutend weiter vorgeschritten (Tafel III Fig. 25 u. 26).

Es zeigten sich schon gebräunte infizierte Zellen, die vom Zellverbande getrennt waren. Zwischen der vierten und fünften Woche wurde die Bildung des Hartigschen Flechtwerks festgestellt. Im Laufe der fünften Woche wurde eine Anzahl von Pflänzchen ohne Erfolg untersucht; alle Wurzeln ohne Ausnahme waren gebräunt. Die Pilze dringen offenbar nur in die jungen, noch unvergilbten Gewebe ein, wie ja auch bei der Mycorhizenbildung an den Seitenästchen Infektion immer nur an dem jungen Gewebe kurz hinter der Spitze festgestellt wurde. Ganz anders bei den endotrophen Pilzfäden; diese dringen immer erst in schon absterbenden Zellen ein, in Zellen also mit mehr oder weniger gebräunten Wänden. Sind sie einmal eingedrungen, dann gelingt es ihnen auch wohl, wie schon erwähnt, in die lebenden Zellen zu kommen und erfahren dann die bekannte Deformation.

Die junge Wurzel entledigt sich der infizierten Zellen sehr energisch; da, wo reichlichere Infektion stattgefunden hatte, war regelmäßig Bräunung der Zellwände und zum Teil auch Loslösung der Zellen vom Zellverbande zu konstatieren. Mit der vollkommenen Bräunung der Wurzel sind meist wohl auch alle infizierten Zellen abgestoßen. Bei einer sechs Wochen alten Wurzel zeigten sich allerdings in einigen tiefer liegenden Interzellularen eines Querschnittes vom oberen Ende reichlich Hyphen. (Tafel III, Fig. 27.)

Die äußerste Zellschicht hatte kutikularisierte Außenwände, darüber lag eine Schicht gebräunter, obliterierter Rindenzellen. Diese eigentümliche Anordnung ist wohl darauf zurückzuführen, daß Einwirkung von Licht eine nachträgliche Umbildung zu sproßartigem Habitus in der Kutikularisierung der Außenwände bewirkt hatte. Die äußeren Interzellularen waren vollkommen frei von Infektion, ebenso der untere Teil der Wurzel überhaupt. Es mußten also die Hyphen von unteren Wurzelteilen in die Höhe gewachsen sein. Während die infizierten Partien der unteren Wurzelteile abgestoßen worden waren, war die junge Infektion der oberen Wurzel noch erhalten. Schwache Gelbfärbung der Zellwände ließ vermuten, daß auch hier binnen kurzem Abschürfung erfolgt wäre.

Die energische Beseitigung des Pilzes ist auf das schnelle Wachstum der jungen Wurzel zurückzuführen. Daß dieses die Infektion hindert oder doch erschwert, ist ja bekannt und wurde besonders von Stahl in eingehenden Untersuchungen zugleich über Wasserdurchströmung dargetan. Sarauw[1]) nimmt noch eine Wachstumssteigerung nach der Abschürfung an: „Die Wurzeln, welche das stärkste Wachs-

[1]) Sarauw: „Über die Mycorhizen der Waldbäume". Revue mycologique 1903, T. XXV, No. 100, p. 157—172.

tum besitzen, schürfen den Pilz ab und entwickeln sich darnach kräftiger, während die kurzen Wurzeln deren Raub werden und bleiben."

Das Hartigsche Flechtwerk zeigte sich zum ersten Male bei einer etwa vier Wochen alten Wurzel; zum Teil war es erst im Entstehen begriffen, zum Teil schon ausgebildet. An Längsschnitten konnten die einzelnen Stadien genau festgestellt werden. Die Hyphen wachsen regellos über die Zellwände, berühren sich und legen sich aneinander. Im weiteren Verlaufe werden gewisse Partien der Hyphenwände aufgelöst und damit das Netzwerk fertig gebildet (Tafel III Fig. 28 u. 29).

Tafel IV Fig. 30 zeigt an einem Querschnitt derselben Wurzel das Eindringen von Hyphen mit Schnallenfusionen. Schon längst wurde vermutet, daß Schnallen bildende Pilze an der Mycorhiza beteiligt sind (Frank, v. Tubeuf, Noack, Kramar). Doch waren immer ältere Wurzeln die Objekte der Untersuchung gewesen, Wurzeln, die schon längst allen möglichen Infektionen ausgesetzt gewesen waren und deren Verbindung mit Schnallenhyphen eine rein oberflächliche sein konnte, umsomehr, als man im Innern der Wurzel keine Schnallen feststellen konnte. Daß die Schnallenhyphen tatsächlich an der Mycorhizenbildung beteiligt sind, unterliegt nun keinem Zweifel mehr, da auch an dem noch nicht ausgebildeten Hartigschen Flechtwerk die Schnallen festgestellt werden konnten (Tafel III, Fig. 28 u. 29).

Nach der Bräunung der ganzen Wurzel erfolgt weiteres Wachstum mit einer hellen Spitze. Damit ist wieder eine Stelle gegeben, an der Infektion stattfinden kann. Verfasser konnte an zwei *Picea*-Pflänzchen, welche bereits Seitenwürzelchen angelegt hatten — sie waren etwa zwei Monate alt — nahe der Spitze der Hauptwurzel eine Infektion feststellen. Die Meinung von Sarauw[1]) und Möller[2]), daß die Hauptwurzelspitze nicht infiziert werden kann, trifft also nicht zu.

Die energische Art, mit der sich die junge Wurzel der Infektion erwehrt, ist wiederum ein Beweis, daß es sich bei der ektotrophen Mycorhiza um keine Symbiose handeln kann, von der die Wirtspflanze einen nennenswerten Nutzen hat. Auch würde es sonst zu irgendwelchen dauernden Einrichtungen gekommen sein.

Auch bei der Mycorhizenbildung an Seitenästchen werden ja die infizierten Gewebe schließlich abgestoßen. Schon Hartig hatte die Ansicht ausgesprochen, daß die Baumwurzeln nicht dauernd von dem Pilz bekleidet seien, daß sie erst im Herbst und Winter von den Pilzen befallen würden und daß im Sommer zahlreiche neugebildete Wurzelspitzen völlig pilzfrei seien. Möller hat beobachtet, daß im April alle pilzbefallenen Zellen durch die neu sich bildende Korkschicht abgestoßen werden.

Auch der Pilz der ektotrophen Pilzwurzel kann nicht viel Vorteil von der Wirtspflanze haben, da er zwischen den Zellen lebt. Er wird, wie Sarauw vermutet, hauptsächlich Wasser dort suchen. Schließlich wird er ja offenbar — die Erscheinung des Hartigschen Flechtwerks beweist dies — von der Wirtspflanze getötet. Gegen perniziösen Parasitismus spricht natürlich die allgemeine Verbreitung der Pilzwurzel und der Umstand, daß die Wirtspflanze keinen ersichtlichen Schaden erleidet. Es wird also den Tatsachen die Ansicht „des ertragbaren Parasitismus" am nächsten kommen, wobei der Wirtspflanze wohl ein Schaden, jedoch kein nennenswerter, vom Pilze zugefügt wird, bis sie den ungebetenen Gast unschädlich macht. Endgültig wird die Frage erst zu lösen sein, wenn man die Pilze kennt, die hier in Betracht kommen.

[1]) Sarauw: Sur les Mycorhizes des arbres forestiers et sur le sens de la symbiose des racines 1903:
„Sur les longues racines du Pinus Strobus je trouvai ce qui suit: la pointe de la racine est entourée d'une forte coiffe. En arrière de celle-ci, la surface est dépourvue de champignon". Weiterhin: „De ce mode d'organisation que je viens de décrire chez la Pinus Strobus et qui existe également chez les autres Conifères et chez les Cupulifères . . . ."

[2]) Möller: Untersuchungen über ein- und zweijähr. Kiefern 1903, S. 326: „Niemals ist die Spitze der Hauptwurzel verpilzt". Da Möller kurz vorher davon spricht, daß das Eindringen der Pilze in die Seitenwurzeln nicht an der Spitze, sondern dicht unter derselben erfolgt, ist also mit der „Spitze" der Hauptwurzel auch die Zone kurz hinter derselben gemeint.

IV. Wiederholte Versuche, auf analytischem Wege einen Mycorhizenpilz zu bekommen.

Da manche Untersuchungen von Interesse sein dürften, seien sie hier mitgeteilt, obwohl die Synthese mit den gewonnenen Pilzen resultatlos verlief.

Fichtenwurzeln, bei denen die Untersuchung Mycorhizen ergeben hatte, wurden zerschnitten, unter Zugabe von wenig Wasser im Mörser zerstoßen und die erhaltene Flüssigkeit filtriert. Diese, zuvor gelb, nahm bei der Sterilisation eine braune Farbe an. Außerdem wurden einige Petrischalen, in welche weißes Filtrierpapier gelegt worden war, im Heißluftapparat sterilisiert, darauf im strömenden Dampf das sterilisierte Filtrat in die Petrischalen gegossen und zwar so, daß das Papier gleichmäßig durchtränkt war. Dann wurden die Saugwurzeln von Fichtenpflänzchen mikroskopisch untersucht und einige, bei denen sich ein Pilzmantel feststellen ließ, eine halbe Stunde im fließenden Wasser abgewaschen, dann mit dem sterilisierten Rasiermesser in dünne Scheibchen zerschnitten und diese auf das feuchte Fließpapier gelegt.

Dieses Verfahren wurde zweimal, jedesmal mit frischen Wurzeln, eingehalten. Beim ersten Versuch zeigte sich nur bei einem einzigen Scheibchen nach zwei Tagen deutliches Aussprossen septierter Hyphen von ziemlicher Dicke (4—6 μ) mit basipetaler Conidienbildung; diese, sowie die Anordnung der Conidienträger und Sterigmen ließen auf eine *Penicilliumart* schließen. Bei zehn Scheibchen war keine Sproßung erfolgt.

Beim zweiten Versuch waren an der Peripherie eines Scheibchens reichlich Mycelfäden ausgesproßt, die wie Oidienketten aussahen, ähnlich wie sie bei *Irpex*, *Pholiota*, *Hypholoma* und *Collybia*, also bei Hydneen, und Agaricineen vorkommen. Unter den Ascomyceten bildet wohl noch *Endomyces* ähnliche Oidienketten, doch ist von diesem Pilz nur parasitische Lebensweise in den Fruchtkörpern von *Armillaria mellea* bekannt. Ein weiterer Faden hatte gänzlich runde, oidienartige Bildungen, die in gewissem Sinne an eine sehr kleine *Nostocacee* erinnerten; doch fehlten Heterocysten und jede blaugrüne Färbung.

Zwei andere Scheibchen zeigten ebenfalls sprossende Hyphen, doch ohne Septierungen, ein viertes hatte Hyphen, die in Oidien zerfallen waren, doch von anderer Art als die besprochenen, abgerundet und durch Zwischenräume getrennt, so daß man im Zweifel sein konnte, ob man es mit Oidien- oder Gemmenbildung zu tun hatte. Ein letztes Scheibchen zeigte neben solchen Hyphen noch die genannten ohne Septen.

Der Umstand, daß sich aus einem einzigen Saugwurzelstück von wenigen Millimetern Länge vier verschiedene Sprossungen ergaben, die wahrscheinlich auch auf vier verschiedene Pilze zurückzuführen waren, zeigt, daß diese Methode kein Mittel ist, einen Mycorhizenpilz ohne weiteres zu finden, will man nicht annehmen, daß an einer einen Bruchteil eines Millimeters dicken Wurzelzone mehrere Pilze an der Mycorhizenbildung beteiligt sind. Immerhin war man zu der Annahme berechtigt, daß sie ein Mittel an die Hand gibt, durch Bestimmen und Reinkultur der erhaltenen Pilzformen und nachträgliche Infektion auf steril gezogene Wurzeln schließlich doch einen Mycorhizenpilz zu finden.

Ein Spezifikum für einen Mycorhizenpilz, wie P e k l o angibt, ist das Decoct nicht.

Auch die weiteren Bemühungen, auf dem Wege der Trennung zum Ziele zu kommen, seien mitgeteilt, obwohl die mehrere Monate hindurch fortgesetzten Versuche nur negative Resultate ergeben haben.

Das Auslegen von Schnittstückchen der Mycorhiza auf verschiedene neue Nährmedien erwies sich bald als ungeeignet. Abgesehen davon, daß angesäuerte Nährgelatine und Agar überhaupt kein Wachstum zeigten, wurden Kulturen auf ungesäuerter Nährgelatine und auf Agar + Mycorhizendecoct bald von Schimmel- und anderen Pilzen und Bakterien derart überwuchert, daß an eine Reinkultur nicht gedacht werden konnte. Auch das reichlichste Abspülen der Wurzel kann nicht genügen, Verunreinigungen abzuhalten.

Durch ein gutes Verfahren gelang es schließlich, aussprossende Hyphen r e i n auf ein Substrat zu bringen. In Glasdosen, deren Deckel durchlocht war, wurde Filtrierpapier gelegt, letzteres stark angefeuchtet, darauf einige Korkstückchen und über diese ein Objektträger, wie er zum Mikroskopieren dient, gelegt; dann wurde die Öffnung im Deckel mit Watte verstopft, durch dies ein Platindraht gesteckt und die

so präparierte Schale im Autoclaven sterilisiert. Nachdem auch das Nährmedium im Dampftopf sterilisiert war (Agar + Mycorhizendecoct und Nährgelatine ohne Säurezusatz), wurde die sterilisierte Dose in strömenden Dampf gestellt, darauf in diesem von dem sterilisierten Nährmedium einige Tropfen auf den Objektträger in der Dose gegossen. Waren die Tropfen in festen Zustand übergegangen, dann wurde mit sterilisiertem Rasiermesser die gut abgespülte Pilzwurzel in kleine Scheibchen geschnitten, diese an die Spitze des Platindrahtes gebracht und letzterer so orientiert, daß die Scheibchen nur $^1/_2$—1 mm vom Substrat entfernt waren. Nach fünf bis acht Tagen zeigte sich bei durchschnittlich der Hälfte der Versuche ein Aussprossen der Hyphen, die nach einigen weiteren Tagen auf das Substrat übertraten und von da auf verschiedene Nährmedien: Brot, Nährgelatine und Humus, übergeimpft wurden. Als Schnittobjekte waren Mycorhizen von *Abies pectinata*, *Picea excelsa* und *Pinus Strobus* verwendet worden.

Im ganzen wurden drei verschiedene Pilze gewonnen: fünfmal ein und derselbe Conidienpilz (Tafel IV Fig. 31—34) teils von *Picea*, teils von *Abies*, einmal ein zweiter von *Abies* und einmal ein dritter von *Picea*. Die beiden letzteren bildeten keine Fruktifikation und konnten deshalb nicht bestimmt werden. Der erstere ist eine *Fusarium*-Art. Alle drei Pilze wurden mit steril gezogenen Pflänzchen zusammengebracht, teils mit *Picea*-, teils mit *Abies*-Pflänzchen im Alter von zwei bis fünf Wochen. Die Pflänzchen wurden nach acht und vierzehn Tagen untersucht.

War die Synthese auf einem Substrat vorgenommen worden, das wie Brot oder Nährgelatine der Wurzel kein Gedeihen erlaubte, dann wurden sie schon fünf bis acht Tage nach der Vereinigung untersucht.

Die Ergebnisse waren, wie gesagt, negativ. Keiner der drei Pilze war interzellular eingedrungen. Dabei war stets darauf geachtet worden, daß die Wurzeln in die Nähe des Mycels zu liegen kamen; Berührung der Wurzel mit Mycel war auch bei allen eingetreten. Der Conidienpilz war wohl eingedrungen, aber nicht nur interzellular, sondern auch intrazellular und hatte die Gewebe zum Teil zerstört. Die beiden andern hatten sich völlig harmlos verhalten und waren an der Peripherie der Wurzel hingewachsen.

Damit war die Unwahrscheinlichkeit des Gelingens solcher Versuche abermals dargetan und die theoretische Erwägung, daß der Pilz nach dem Eindringen in die Wurzel eine Veränderung erleidet und deshalb gar nicht herauswachsen k a n n, als begründet erwiesen.

Die überraschenden Ergebnisse der Versuche mit unsterilisiertem Humus ließen dann die analytische Methode wiederum in freudigerem Lichte erscheinen. Denn wenn noch nicht Bräunung eingetreten ist, wenn es sich um eine junge, frisch infizierte Wurzel handelt, muß immerhin an die Möglichkeit gedacht werden, daß man den Pilz herausbekommt, teils weil die junge Wurzel noch nicht so vielen Verunreinigungen ausgesetzt war, teils weil der frisch eingedrungene Pilz die Fähigkeit, in feuchte Luft herauszuwachsen, noch eher besitzt. Die Methode des Herausstanzens, wie sie B u r g e f f bei den Orchideen angewendet hat, ist bei den so dünnen Objekten der Mycorhizen nicht möglich. Außerdem dringen die Pilzfäden nicht tief in das Gewebe ein, so daß durch das Stanzen gerade der Teil, in dem die Pilzfäden sich befinden, zerstört würde oder verloren ginge.

Da die Wurzeln der auf unsterilisiertem Humus gewachsenen *Picea*-Pflänzchen inzwischen alle gebräunt waren und die helle Zone hinter der Spitze zu kurz ist, um zu solchen Versuchen tauglich zu sein, wurde eine neue Kultur angelegt. Nach langem Suchen fand sich endlich eine Wurzel mit frischer Infektion. Die Pilzgewinnung wurde in der beschriebenen Weise vorgenommen. Das Ergebnis war ein Conidienpilz, wahrscheinlich eine *Verticillium*-Art. Die Synthesen verliefen sämtlich resultatlos.

V. Letzte synthetische Versuche.

Um die Ergebnisse der Synthesen zwischen den Hymenomyceten und den Abietineen nochmals zu prüfen — da die Infektion, wie nun nachgewiesen, schon sehr früh stattfinden kann, war dies nun leicht — wurden die Kulturen der Pilze erneuert und junge, acht Tage alte *Picea*-Wurzeln mit den Mycelien zusammengebracht. Obwohl nun an dem alten Ergebnis sich nichts änderte, brachten die Versuche eine

Überraschung. Unter den in Kultur genommenen Pilzen war auch eine *Russula*-Art, *Russula virescens*, gewesen (Tafel IV Fig. 36—47).

Da von dem Pilz kein Identitätsnachweis geliefert werden konnte — er bildete weder Schnallen noch irgend eine Fruktifikationsform, noch galt er überhaupt als kultivierbar (B r e f e l d) — war er bei der erstmaligen Synthese übergangen worden. Diesmal wurde er zur Synthese verwendet und zwar mit vierzehn Tage alten Wurzeln von *Pinus Pinea* und *Picea*. Nach acht Tagen zeigten die Wurzeln von *Pinus Pinea* deutlich ektotrophe Verpilzung; der Pilz war typisch interzellular eingedrungen (Tafel IV Fig. 35).

Daraufhin wurden sechs neue Synthesen vorgenommen, drei mit *Picea* und drei mit *Pinus Pinea*. Die Untersuchung nach vier Wochen ergab bei drei Pflänzchen interzellulare Infektion; in zwei Fällen (*Picea*) war überhaupt keine Infektion eingetreten, obwohl die Wurzeln mit Mycel in Berührung gekommen waren, und in einem Falle (*Pinus Pinea*) war das Mycel sekundär auch i n t r a z e l l u l a r eingedrungen. In diesem Falle sah jedoch das Pflänzchen nicht mehr gesund aus; da die anderen mit interzellularer Infektion gesund aussahen, ist zu vermuten, daß eine Schwäche des Pflänzchens das Primäre war und dem Pilz erst einen direkten Angriff auf das Plasma möglich machte, daß es sich in diesem Falle also um keinen perniziösen Parasitismus handelte.

D. Die wichtigsten Ergebnisse sämtlicher Untersuchungen.

Die monatelang fortgesetzten Versuche, auf analytischem Wege zu einem Mycorhizenpilz zu kommen, haben ergeben, daß solche Versuche nahezu aussichtslos sind. Dies ist jedoch nicht dadurch bedingt, daß alle möglichen Pilze sich entwickeln — man könnte ja schließlich doch den richtigen herausfinden — sondern dadurch, d a ß d i e M y c o r h i z e n p i l z e ü b e r h a u p t n i c h t a u s d e r W u r z e l h e r a u s w a c h s e n. Als es dem Verfasser gelungen war, bei ganz jungen *Picea*-Wurzeln schon Infektion durch einen Mycorhizenpilz festzustellen, nachdem die Samen auf unsterilisiertem Humus ausgelegt worden waren und binnen acht Tagen gekeimt hatten, war noch am meisten Aussicht auf Erfolg gegeben. Denn wenn die Wurzel noch jung ist, kann sie noch nicht von vielen Pilzkeimen befallen sein; a n d e r s e i t s h a t d e r f r i s c h e i n g e d r u n g e n e P i l z n o c h k e i n e V e r ä n d e r u n g e r l i t t e n. Daß er diese erleidet, unterliegt keinem Zweifel und ist wohl der Hauptgrund, warum all die vielen bis jetzt unternommenen Versuche, einen Mycorhizenpilz durch Analyse zu gewinnen, vergeblich gewesen sind. Die synthetischen Versuche mit dem unter den genannten günstigsten Umständen gewonnenen Pilz verliefen ebenfalls resultatlos. E i n e Möglichkeit, daß unter den gezüchteten Pilzen echte Mycorhizabildner sind, ist allerdings noch gegeben: w e n n n ä m l i c h d i e B i l d u n g d e r M y c o r h i z a v o n b e s t i m m t e n p h y s i k a l i s c h e n o d e r c h e m i s c h e n B e d i n g u n g e n a b h ä n g i g i s t, w i e s i e n u r i n d e r N a t u r u n d b e s o n d e r s i m u n s t e r i l i s i e r t e n H u m u s g e g e b e n s i n d. Dies ist freilich nicht unwahrscheinlich und läßt die Möglichkeit einer Lösung der Mycorhizenfrage auf experimentellem Wege sehr gering erscheinen. D a g e g e n spricht das Verhalten des kultivierten *Russula*-Pilzes, der tatsächlich interzellular eingedrungen ist. Daß der genannte Pilz wirklich *Russula virescens* ist, kann Verfasser nicht beweisen. Denn er bildete bis jetzt weder Schnallen noch irgend eine Haupt- oder Nebenfruktifikation; auch ist noch keine *Russula*-Art in Reinkultur gezogen worden, da alle Kulturen bis jetzt mißlungen sind.

I n b e z u g a u f d i e ü b r i g e n k u l t i v i e r t e n H y m e n o m y c e t e n s t e h t f e s t, d a ß d i r e k t e, M y c o r h i z e n a n s t r e b e n d e B e z i e h u n g e n z w i s c h e n i h n e n u n d d e n k u l t i v i e r t e n A b i e t i n e e n, u n a b h ä n g i g v o n b e s o n d e r e n p h y s i k a l i s c h - c h e m i s c h e n B e d i n g u n g e n, n i c h t b e s t e h e n. Das Bild der ektotrophen Mycorhiza zeigte sich gar nicht, weder bei der ersten Synthese, noch bei der zweiten, als die Pilze nochmals mit jungen Wurzeln

zusammengebracht worden waren. Das Bild der endotrophen Mycorhiza bot sich ein einziges Mal, bei einer Synthese zwischen *Collybia macrourus* und *Pinus Strobus*. Gebräunte Zellen waren häufig von Hyphen durchzogen. Untersuchungen, die an ganz jungen *Picea*-Pflänzchen, deren Samen auf unsterilisiertem Humus gekeimt hatten, gemacht wurden, hatten die Feststellung der überraschenden Tatsache zur Folge, daß schon acht Tage nach der Keimung Infektion durch einen Mycorhizenpilz erfolgen kann und zwar im ganzen Verlaufe der Wurzel. Nach etwa vier Wochen kommt es zur Bildung des Hartigschen Flechtwerks, jedoch nicht immer; manchmal werden die infizierten Zellen schon nach drei bis vier Wochen abgestoßen. Nach fünf bis sechs Wochen ist die ganze Wurzel gebräunt und hat sich meist aller infizierten Zellen entledigt. Die fortwachsende Spitze der Hauptwurzel bleibt nicht, wie Sarauw und Möller meinen, immer von Verpilzung verschont. Bei zweien etwa zwei Monate alten *Picea*-Wurzeln war die Spitze der Hauptwurzel reichlich verpilzt.

Die Heftigkeit, mit der die junge Pflanze die infizierten Zellen abschürft, deutet direkt darauf hin, daß es sich bei der ektotrophen Mycorhiza um einen Kampf handelt; der Umstand, daß auch an den kurz bleibenden Seitenästchen im April die infizierten Zellen durch die neu sich bildende Korkschicht abgestoßen werden, zeigt im Zusammenhange mit der heftigen Reaktion der jungen Pflanze auf die Infektion, daß keine Symbiose vorliegen kann, bei der die Wirtspflanze einen nennenswerten Nutzen hat. Im Laufe der Äonen wäre es auch sonst sicher zu einer dauernden Einrichtung gekommen.

Dasselbe gilt für die endotrophe Mycorhiza, soweit man von einer solchen bei den kultivierten Abietineen überhaupt sprechen kann. Auch hier vollzieht sich ein heftiger Kampf. Der Pilz wird vom Zellplasma deformiert und offenbar auch getötet, teils dadurch, daß die Hyphen ein buckeliges und verquollenes Aussehen annehmen, ihr Plasma verlieren und schließlich verschwinden, teils dadurch, daß die eindringenden Fäden mit einem Zellulosemantel umhüllt werden. Dabei findet ein Energieverbrauch auf seiten der Wirtspflanze statt. Selbst bei der Annahme, daß dann die Wirtspflanze durch die Tötung des Pilzes dennoch einen Vorteil davon trägt, kann die endotrophe Mycorhiza der Abietineen wegen ihrer untergeordneten Bedeutung nicht als nutzbringend angesehen werden. Die allgemeine Verbreitung, die Möller der endotrophen Pilzwurzel der Kiefer zuschrieb, besteht nicht. Er kam zu dieser Ansicht dadurch, daß er auch die in gebräunten Zellen und dort viel häufiger vorkommenden normalen Hyphen mit der endotrophen Mycorhiza in Beziehung brachte. Die gebräunten Zellen können aber nicht mehr als lebend im Sinne der Mycorhiza betrachtet werden. Die endotrophen Pilzfäden traten bei den untersuchten Abietineen mit einer gewissen Regelmäßigkeit auf. Immer zeigten sich an den Ästchen — vom apikalen Ende ausgehend — zuerst normale Hyphen, die regellos die gebräunten Zellen durchzogen, bis plötzlich die Fäden zum Teil nicht mehr in gebräunten, sondern in lebenden Zellen mit unvergilbten Zellwänden zu sehen waren und ein völlig verändertes Aussehen zeigten. Sie hatten eine Degeneration durch das Zellplasma erfahren.

Die Bildung des Hartigschen Flechtwerks konnte, da ganz frisch infizierte Wurzeln zur Verfügung standen, an Längsschnitten genau verfolgt werden. Die Hyphen wachsen nach allen Richtungen durch die Interzellularen und legen sich einander an; durch Auflösung einzelner Partien der Hyphenwände kommt das eigentümliche Geäst zustande. Der Sinn dieses Vorganges ist nicht zu verstehen, wenn man nicht annimmt, daß auch hier der Pilz von der Wirtspflanze getötet wird, in diesem Falle auf exosmotischem Wege. Verfasser hat durch Beobachtung mit den stärksten Vergrößerungen genau feststellen können, daß schon bald nach dem Aneinanderlegen der Hyphen kein Plasma mehr in ihnen ist. Das Hartigsche Flechtwerk stellt mithin Rudimente der eingedrungenen Pilzfäden dar.

Bei Gelegenheit dieser Untersuchungen zeigten sich auch Schnallen an den das Flechtwerk bildenden

Hyphen. Damit ist bewiesen, daß Schnallen bildende Hyphen wirklich, wie man schon vermutet hat, eine ektotrophe Pilzwurzel bilden können.

Eine Schlußfolgerung, die sich nach verschiedenen Befunden von selbst aufdrängt, ist die Annahme, daß der Pilz im Pflänzchen — in der Wurzel oder im hypocotylen Gliede — unter Umständen seine Herkunft gar nicht vom Substrat, sondern vom Samen ableitet. Erst der Umstand, daß die Kulturen mit peinlicher Sorgfalt steril hergestellt worden waren, ließ diese Deutung des Auftretens fremder Sporen in der Wurzel, von fremdem Mycel in Wurzel und hypocotylem Gliede zu. Bekräftigend auf diese Anschauung wirkte die große Ähnlichkeit zweier Sporen mit von Neger in Tannensamen gefundenen.

Eine Schwierigkeit, die die Möglichkeit der vorliegenden Untersuchungen zum Teil von Anfang an in Frage stellte, lag darin, daß die Sporen von Humusbewohnern in der Regel auf künstlichem Substrate nicht keimen. Noch in seinen neuen Untersuchungen 1908 Heft XIV, Seite 48 wiederholt Brefeld seine schon früher gewonnene Überzeugung, daß es besonders die den Boden bewohnenden Pilze seien, welche die Keimung versagen. Verfasser gelang es, von dreiunddreißig in Kultur genommenen Pilzen zehn dauernd in Reinkultur zu erhalten. Die Kultur von *Lactarius deliciosus, Hydnum imbricatum* und *Russula virescens* war bis jetzt noch nicht gelungen; noch nicht in Kultur genommen waren, soweit dem Verfasser bekannt, *Agaricus albus* Schaeffer, *Hypholoma lateritium, Collybia macrourus* und *Tricholoma bicolor*. Bis zur Fruchtbildung gediehen sehr leicht die *Coprinus*-Arten, ferner wurde Fruktifikation erzielt bei *Collybia macrourus* und *Tricholoma bicolor*. Der Umstand, daß *Coprinus nycthemerus* ganz verschieden große, ferner *Tricholoma bicolor* eine Reihe ganz kleiner Fruchtkörper ausbildete, birgt eine Nutzanwendung für die Systematik. Erst die Kultur kann darüber Aufschluß geben, ob die verschiedenen Fruchtkörper auch wirklich verschiedenen Pilzen angehören. —

Seinen tief gefühlten Dank spricht Verfasser Herrn Prof. v. Tubeuf aus für Überlassung von Material und der einschlägigen Literatur.

München, botanisches Institut der forstlichen Versuchsanstalt, im Juni 1910.

Wichtigste Literatur.

(Chronologisch geordnet.)

Hartig: Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Kulturpflanzen Deutschlands. Berlin 1851.

Janczewski: Das Spitzenwachstum der Phanerogamenwurzeln. Botan. Zeitung 1874, Seite 113.

M. Reeß: Über den Parasitismus von Elaphomyces granulatus. Sitz.-Ber. der phys. med. Societät zu Erlangen. 1880, VIII, Seite 5 (Refer. im Botan. Centralbl. 1880, Bd. 37, Seite 1094.

Kamienski: Die vegetativen Organe von Monotropa hypopitys. Botan. Zeitung 1881, Seite 457.

G. Gibelli: Nuovi studi sulla mallattia del Castagno. Memorie dell'Accad. di Scienza dell'Istit. di Bologna 1883, Ser. IV, Vol. IV.

Frank: Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber. der Deutschen bot. Gesellschaft 1885, Bd. III, Seite 128.

M. Reeß: Über Elaphomyces und sonstige Wurzelpilze. Ber. der Deutschen bot. Ges. 1885, Bd. III, Seite 293.

Wahrlich: Beitrag zur Kenntnis der Orchideenwurzelspitze. Botan. Zeitung 1886, Seite 482 und 498.

M. Reeß und C. Fisch: Untersuchungen über Bau und Lebensweise der Hirschtrüffel, Elaphomyces. Bibliotheca botanica 1887, Heft 7.

Frank: Über die physiologische Bedeutung der Mycorhiza. Ber. der Deutschen bot. Ges. 1888, Bd. VI, Seite 248.

Schlicht: Beitrag zur Kenntnis der Verbreitung und der Bedeutung der Mycorhiza. Inaug.-Dissertation 1889.

Brefeld: Mycologische Untersuchungen 1889, Heft III, IV und VIII.

Fr. Noack: Über Mycorhizen bildende Pilze. Bot. Zeitung 1889, Seite 389.

Oliver: On Sarcodes sanguinea, Torr. Annals of Botany 1890, p. 303.

P. Groom: On Thismia Aseroe (Beccari) and its Mycorhiza. Annals of Botany 1895, p. 327.

v. Goebel: Über Jugendformen von Pflanzen und deren künstliche Wiederhervorrufung. Sitz.-Ber. der math. phys. Klasse der k. b. Akademie der Wiss. 1896.

v. Tubeuf: Die Haarbildungen der Koniferen. Naturw. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft 1896, 4. Heft, Seite 125, 5. Heft, Seite 173.

J. M. Janse: Les endophytes radicaux de quelques Plantes Javanaises. Annales du jardin botanique de Buitenzorg 1897, Vol. XIV, p. 53.

Nobbe und Hiltner: Die endotrophe Mycorhiza von Podocarpus und ihre physiologische Bedeutung. „Die landwirtschaftl. Versuchsstationen" 1899, Bd. 51, Seite 241.

U. Kramàr: Studie über die Mycorhiza von Pirola rotundifolia. Bulletin intern. de l'Akademie des sciences de Bohême 1899 (Refer. im Bot. Centralblatt 1900, Bd. 81, Seite 376).

H. v. Schrenk: A sclerotioïd disease of Beech roots Contribution from the Shaw School of Botany 1899.

Hiltner: Über die Assimilation des freien atmosphärischen Stickstoffs durch in oberirdischen Pflanzenteilen lebende Mycelien. Centralblatt für Bakteriologie 1899, Bd. V, Seite 831.

Stahl: Sinn der Mycorhizenbildung. Jahrb. für wiss. Botanik 1900, Bd. 34, Seite 539.

W. Magnus: Studien über die endotrophe Mycorhiza von Neottia Nidus avis. Jahrb. für wiss. Botanik 1900, Bd. 35, Seite 205.

M. Ferguson: A preliminary study of the germination of the spores of Agaricus campestris and other Basidiomycetes Fungi. U. S. Depart. of Agric. 1902.

Shibata: Cytologische Studien über die endotrophe Mycorhiza. Jahrb. für wiss. Bot. 1902, Bd. 37, Seite 643.

P. E. Müller: Sur deux formes de Mycorhizes chez le pin de Montagne. Akad. royale de science et des lettres de Danemark 1902.

Möller: Untersuchungen über ein- und zweijährige Kiefern im märk. Sandboden. Zeitschr. für Forst- und Jagdwesen 1902/1903.

M. G. Sarauw: Sur les Mycorhizes des arbres forestiers. Revue mycologique 1903, T. XXV. No. 100, p. 157—172 (Refer. i. bot. Centralblatt 1904, Bd. 45, Seite 159).

v. Tubeuf: Beiträge zur Mycorhizenfrage. Naturw. Zeitschr. für Forst- und Landwirtschaft 1903, 2. Heft, Seite 67.

F. E. Weiß: A Mycorhiza from the Lower Coalmesures. Annals of Botany 1904, Bd. 38, p. 255.
B. Nemeč: Über die Mycorhiza bei Calypogeia trichomanis. Botan. Centralblatt 1904, Bd. 95, Seite 538.
P. Jacard: Les Mycorhizes et leur rôle dans la nutrition des essences forestiers. Journal forestier Suisse 1904, No. 2 et 3 p. 30.
Duggar: The principles of mushroom growing and mushroom spawn making. Bureau Plant. Ind. U. S. Depart. Agric. 1905. Bull. 85, p. 1—60.
P. E. Müller et Fr. Weis: Studier over Skov-og Hedejord. Forstl. Forsogsvaesen 1906, S. 235—320.
E. Küster: Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. Leipzig und Berlin 1907.
L. H. Pennington: Mycorhiza-producing Basidiomycetes. Rept. Michigan Akademie of science X 1908.
Rumbold: Beiträge zur Kenntnis der Biologie holzzerstörender Pilze. Naturw. Zeitschr. für Land- und Forstwirtschaft 1908, 2. Heft, Seite 81.
J. Peklo: Die epiphytischen Mycorhizen nach neuen Untersuchungen. Bulletin intern. de l'Akademie de sciences de Boheme 1908, p. 87.
J. Peklo: Beiträge zur Lösung des Mycorhizenproblems. Ber. der Deutschen bot. Ges. 1909, Bd. 27, Seite 239.
H. Burgeff: Die Wurzelpilze der Orchideen. Jena 1909.
F. W. Neger: Beobachtungen und Erfahrungen über Krankheiten einiger Gehölzsamen. Thar. forstl. Jahrbuch 1909, Bd. 60, Seite 222—252.
N. Bernard: L'evolution dans la symbiose. Les Orchidees et leurs Champignons commensaux. Annales de sciences naturelles 1909, 9. Ser. Bot. IX 1, p. 1—64, 2/3, p. 65—191.

Lebenslauf.

Verfasser, geboren 31. Mai 1877 als Sohn des pr. Arztes Dr. Joseph Fuchs und seiner Ehefrau Maria, geb. Götzendorfer, besuchte bis zu seinem 10. Jahre die Volksschule in Sendling-München, dann das Kgl. Luitpoldgymnasium; nach Absolvierung desselben im Jahre 1896 widmete er sich an der Universität München juristischen Studien; später folgte er seiner Neigung, dem Studium der Naturwissenschaften, arbeitete im pflanzenphysiolog. Institut der Universität, im botan. Institut der tierärztlichen Hochschule und zuletzt im botan. Institut der forstlichen Versuchsanstalt, wo er auch vorliegende Arbeit ausführte.

München, im Juni 1910.